Aus dem Tropenmedizinischen Institut der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. H. J. Knüttgen

Die chemotherapeutische Beeinflussung der experimentellen Malaria (Plasmodium berghei) in der Maus durch Terramycin, p-Aminosalicylsäure und Isothiocyanate

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Dr. rer. nat. Rolf Heischkeil
aus Altensteig

1969

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547611_0064

Aus dem Tropenmedizinischen Institut der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. H. J. Knüttgen

Die chemotherapeutische Beeinflussung der experimentellen Malaria (Plasmodium berghei) in der Maus durch Terramycin, p-Aminosalicylsäure und Isothiocyanate

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Dr. rer. nat. Rolf Heischkeil
aus Altensteig

1969

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan: Professor Dr. J. Hirschmann

1. Berichterstatter: Privatdozent Dr. W. Kretschmar
(Professor Dr. H.J. Knüttgen)
2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. K.-Fr. Sewing

FOTODRUCK PRÄZIS Barbara v. Spangenberg KG · Tübingen

Inhaltsverzeichnis

		Seite
I	Einleitung und Problemstellung	1
A.	Testverfahren	2
B.	Einteilung der Antimalariamittel	4
C.	Wirkungsmechanismen	6
D.	Ausgewählte Substanzen	6
II	Eigene Untersuchungen	7
A.	Material und Methoden	7
B.	Chemotherapeutische Untersuchungen	9
1.	Zur Versuchsanordnung und Durchführung	9
2.	Zur Chemotherapie mit Terramycin	12
a)	Versuch Terramycin I, Terramycin II und Terramycin III	12
aa)	Körpertemperatur	14
bb)	Hämoglobingehalt	14
cc)	Parasitämie	14
dd)	Diskussion der Ergebnisse	16
b)	Hauptcharakteristika des Terramycins	17
c)	Zum Wirkungsmechanismus der Tetracycline	18
3.	Zur Chemotherapie mit Terramycin und Paraaminosalicylsäure	20
a)	Versuch Terramycin I + 750 mg/kg PAS und Terramycin III + 150 mg/kg PAS	20
aa)	Körpertemperatur	20
bb)	Hämoglobingehalt	21
cc)	Parasitämie	22
dd)	Bewertung der Ergebnisse	23
b)	Hauptcharakteristika der Paraamino-salicylsäure	25
c)	Zum Wirkungsmechanismus der p-Aminosalicyl-säure	27

Seite

4. Zur Chemotherapie mit Isothiocyanaten 30

a) Untersuchungen an den halogenierten Monoaromaten p-Bromphenylisothiocyanat und p-Brombenzylisothiocyanat 32

aa) Körpertemperatur 32

bb) Hämoglobingehalt 32

cc) Parasitämie 33

b) Untersuchungen zu den nichthalogenierten Diaromaten Diphenylisothiocyanat und (1)-Naphthylmethylisothiocyanat 33

aa) Körpertemperatur 33

bb) Hämoglobingehalt 33

cc) Parasitämie 34

c) Untersuchungen zu den Alkyl-phenyl-Sulfonen p-Methylsulfophenylisothiocyanat, p-Äthylsulfophenylisothiocyanat und p-n-Octylsulfophenylisothiocyanat.

c-1) Versuche mit steigender Dosierung der Substanz p-Methylsulfophenyl-isothiocyanat 34

aa) Körpertemperatur 34

bb) Hämoglobingehalt 35

cc) Parasitämie 35

c-2) Vergleichende Untersuchungen zu c) 36

aa) Körpertemperatur 36

bb) Hämoglobingehalt 37

cc) Parasitämie 37

d) Untersuchungen zu den Alkyl-phenyl-Sulfiden p-Methylthiophenylisothiocyanat, p-Äthylthio-phenylisothiocyanat und p-n-Octylthiophenyl-isothiocyanat 38

d-1) Versuche mit steigender Dosierung der Substanz p-Methylthiophenyliso-thiocyanat 38

aa) Körpertemperatur 38

bb) Hämoglobingehalt 38

cc) Parasitämie 39

d-2) Vergleichende Untersuchungen zu d) 39

aa) Körpertemperatur 40

bb) Hämoglobingehalt 40

cc) Parasitämie 40

Seite

e) Untersuchungen zu dem zweifach isothiocyanierten Diphenylsulfon 4.4'-Diisothiocyanatdiphenylsulfon 41

e-1) Versuche mit steigenden Dosierungen der Substanz 4.4'-Diisothiocyanatdiphenylsulfon 41

aa) Körpertemperatur 41

bb) Hämoglobingehalt 42

cc) Parasitämie 42

e-2) Vergleichende Untersuchungen zu den Mono-isothiocyanaten und Terramycin 43

f) Bewertung der Ergebnisse

g) Zum Wirkungsmechanismus der Isothiocyanate 46

III Schlußfolgerungen 48

IV Zusammenfassung 51

V Literaturverzeichnis 53

I Einleitung und Problemstellung

Die Bekämpfung der Malaria nach den von der WHO empfohlenen Richtlinien und Programmen führte in den letzten elf Jahren in Europa, Südamerika und Südostasien zu beachtlichen Teilerfolgen mit dem Ergebnis, daß beispielsweise in Europa die Malaria als Infektionskrankheit praktisch bedeutungslos geworden ist. Diese Tatsachen dürfen jedoch nicht darüber hinwegtäuschen, daß die Ausrottung der Malaria in manchen Gebieten mit ganzjähriger Übertragung bisher kaum Fortschritte gemacht hat - wie z.B. Westafrika (WHO, 1967). In diesen Gebieten ist eine wirksame Vernichtungskampagne durch Überträgerbekämpfung allein nicht möglich. Der Einsatz von Insektiziden garantiert erst dann eine sichere Übertragungsunterbrechung im Sinne einer Ausrottung, wenn er von einem chemotherapeutischen Masseneinsatz begleitet wird (WHO, 1966).

Aus der zunehmenden Häufigkeit der Resistenz von Plasmodium falciparum gegenüber Proguanil (seit 1948), Pyrimethamin (seit 1953) und Chloroquin (seit 1960) ergibt sich zwangsläufig die Notwendigkeit zur Entwicklung neuer Präparate. Besonders im Hinblick auf die Wirkungsabnahme der lange bewährten 4-Aminochinoline Chloroquin und seiner Derivate fordert das Experten-Komitee der WHO (1965) die Entwicklung neuer Chemotherapeutika und eine Ausdehnung der Grundlagenforschung.

Die Auswahl der hier geprüften drei Verbindungsklassen (Terramycin, Paraaminosalicylsäure und Isothiocyanate) basiert auf Überlegungen, den Stoffwechsel der Plasmodien - die Paraaminobenzoesäure für ihre Vermehrung benötigen und sich durch eine schnelle Nukleinsäuresynthese auszeichnen (KRETSCHMAR, 1966a; JERUSALEM und KRETSCHMAR, 1967) - chemotherapeutisch zu beeinflussen:

- Die Prüfung von Terramycin erfolgte im Hinblick auf die Störung metallhaltiger Fermente und der oxydativen Phosphorylierung (ALBERT und REES, 1956; SCHNITZER und HAWKING, 1963),
  die Prüfung von PAS unter dem Gesichtspunkt der kompetitiven PAB-Verdrängung (HEILMEYER, 1965), sowie der Metallchelatbildungsfähigkeit als Störfaktor im Parasitenstoffwechsel (FOYE, 1955),
  die Prüfung von Isothiocyanaten auf Grund Ihres hohen Reaktionsvermögens mit essentiellen Gruppen von Fermenten und Ribonukleinsäuren (DROBNICA, 1965).

A. Testverfahren

Die Entwicklung und Prüfung neuer Heilmittel kann grundsätzlich auf zwei Wegen erfolgen: Durch eine logische Behandlung des Problems oder durch den empirischen Screening-Test (PETERS, 1967).

Bei der logischen Entwicklung würde man drei Schwerpunkte unterscheiden:

1. Die nochmalige Überprüfung und Untersuchung bekannter antimalariawirksamer Verbindungen unter dem Gesichtspunkt potenziert wirkender Kombinationen, bzw. die Testung von Präparaten, die primär für andere Krankheiten indiziert

sind (z.B. Sulfonamide).

2. Die "Rehabilitierung" und Weiterentwicklung von Verbindungen, die bekannterweise wirksam, aber nicht im Gebrauch sind, z.B. Strukturanaloge der Standardtherapeutika, aktive Metabolisierungsprodukte, sowie unvollständig durchgetestete aber wirksame Substanzen.
3. Die Aufklärung des Wirkungsmechanismus unter Ausrichtung auf die Parasitenphysiologie oder aber unter Zugrundelegung gesicherter Struktur-Aktivitätsbeziehungen, wie sie beispielsweise für die Aminopyrimidine von Hitchings 1963 ausgearbeitet wurden.

Der empirische Screening-Test kann entweder gezielt oder blind durchgeführt werden (PETERS, 1967). Im ersten Fall werden bekannte Strukturprinzipien mit Antimalariaaktivität programmiert und in einem Computer zur raschen Ermittlung wirkungsanaloger Verbindungen gespeichert. Im zweiten Fall erfolgt eine Testung grundsätzlich sämtlicher auf chemischem und pharmazeutischem Sektor synthetisierter Verbindungen, um auf diese Weise auch noch mögliche potentielle Außenseiter zu erfassen.

Als Versuchsmodell der Wahl dient heute die Nagetiermalaria (Plasmodium berghei) in der Maus. Versuche mit Primaten und mit niederen Affen sind sehr aufwendig und umständlich, abgesehen davon, daß die aus den experimentellen Resultaten gezogenen Analogieschlüsse nicht mit einer größeren Sicherheit zu bewerten sind als jene, die sich bei Verwendung anderer Säuger anbieten. Voraussetzung für die Durchführung von Therapieversuchen sind standardisierte Versuchsbedingungen (KRETSCHMAR, 1965;PETERS,1967). Hierbei erlaubt die Verwendung der genetisch homogenen NMRI-Maus die Beobachtung eines ausgedehn-

ten Krankheitsverlaufes nach Infektion mit dem Originalstamm von P. berghei, K 172, der gegenüber mischrassigen Mäusen um mehr als das Doppelte verlängert ist (KRETSCHMAR, 1961) und eine genauere Prüfung der Wirksamkeit der Präparate (JACOBI, 1965).

In der vorliegenden Arbeit beschränken sich sämtliche Überlegungen auf die asexuellen erythrozytären Formen des Parasiten, also auf die Schizogoniestadien im Blut der Maus. Geschlechtlich-erythrozytäre und exoerythrozytäre Parasitenstadien und -reservoire, sowie kausalprophylaktische Betrachtungsweisen sollen in diesem Rahmen nicht berücksichtigt werden, da eine zyklische Übertragung (YOELI und MOST, 1965) von P. berghei im Labor erst seit kurzem durchgeführt werden kann und für vergleichende chemotherapeutische Testreihen noch nicht ausreichend standardisiert ist.

Besonders auffällig im Vergleich zur auch heute noch experimentell bearbeiteten Vogelmalaria (P. relictum oder P. cathemerium) ist die gute Übereinstimmung in der chemotherapeutischen Beeinflußbarkeit von P. berghei und P. falciparum und zwar sowohl hinsichtlich der plasmodiostatischen und plasmodioziden Effekte als auch bezüglich der Phänomene der Resistenzbildung (SCHNITZER-HAWKING, 1963; HERRERO, 1966).

B. Einteilung der Antimalariamittel

Die nach dem 1. Weltkrieg einsetzende Ablösung des Chinins durch die Entwicklung einer Reihe synthetischer, hochwirksamer Antimalariamittel erforderte eine immer differenzier-

tere Anwendung der neuen Präparate und führte schließlich zu einer zyklusbezogenen Klassifizierung. So unterscheidet man heute kausalprophylaktische, schizontozide, gametozytozide, sporontozide und sekundär-gewebsschizontozide Verbindungen (WHO, 1966).

Grobschematisch lassen sich die Antimalariamittel nach ihrer Wirkungsweise in zwei Gruppen einteilen: Einmal in Verbindungen, die den PAB-Folsäure-Folininsäurestoffwechsel antagonisieren - wie Sulfonamide, Biguanide und Pyrimethamin - und zum andern in Substanzklassen, die mehr mit dem komplizierteren Stoffwechselgeschehen - wie Phosphatmetabolisierung, Protein- und Nukleinsäuresynthesen und wahrscheinlich sogar mit der Synthesecodifizierung - interferieren. Dazu gehören die höhermolekularen und mehrkernigen Heterozyklen Chinin, Mepacrin, Pamaquin und Chloroquin. Ein zusätzliches Unterscheidungsmerkmal zwischen diesen beiden Gruppen besteht in der Wirkungsgeschwindigkeit und in der Tendenz zur Resistenzausbildung. Während die erste Gruppe sehr leicht zu Resistenzerscheinungen führt und eine nur langsam einsetzende schizontozide Aktivität besitzt, also für die Behandlung des akuten Malaria-Anfalls nicht geeignet ist, zeichnet sich die zweite Gruppe durch einen sehr raschen Wirkungseintritt und nur sehr geringe Neigung zu Resistenzerscheinungen aus. Eine Kreuzresistenz zwischen beiden Gruppen besteht nicht. Diese Tatsache ist auf Grund der verschiedenen Angriffsmechanismen einleuchtend.

C. Wirkungsmechanismen

Ansatzpunkte für die Wirkung von Antimalariamitteln bieten im Stoffwechsel des Parasiten - der wiederum von den physiologischen Reaktionen des Wirtes beeinflußt wird - der kompetitive Antagonismus, die Fermentblockierung, die Fermentinaktivierung, die Fehlverstoffwechselung und die Membranschädigung mit dem Ziel der Störung oder Unterbindung der für den Parasiten lebensnotwendigen Nukleinsäuresynthese. Da diese eine große Anzahl von Syntheseschritten erfordert, wird wegen der bei niederen Organismen potentiell immer vorhandenen Möglichkeit biochemisch befahrbarer Nebengeleise ein chemotherapeutisches Eingreifen umso mehr Aussicht auf Erfolg haben, wenn die entsprechenden Angriffe gleichzeitig an mehreren Stellen der Synthesekette erfolgen: Ein auf den ersten Stufen im biochemischen Reaktionsgeschehen angeschlagener Parasitenorganismus verfügt nicht mehr über voll entfaltbare Ersatzmechanismen und vermag daher mit einer immer geringer werdenden Wahrscheinlichkeit die folgenden, ebenfalls wieder vorgeschädigten oder blockierten Hauptschaltstellen der reaktiven Sequenz zu umgehen.

D. Ausgewählte Substanzen

Im folgenden sollen die Vertreter dreier Verbindungsklassen auf ihre schizontozide Aktivität untersucht werden. Es sind dies

1. das Antibiotikum Terramycin,
2. der PAB-Antagonist PAS, und
3. die biochemisch polyvalenten Isothiocyanate.

II Eigene Untersuchungen

A. Material und Methoden

Zu den Versuchen wurde der von Vincke und Lips im Jahre 1948 isolierten Originalstamm K 173 von Plasmodium berghei verwendet. Die damit infizierten Tiere waren reinrassige Mäuse des Stammes NMRI, die sich durch eine besonders große Resistenz gegen die Nagetiermalaria auszeichnen (KRETSCHMAR, 1961, 1962).

Die Mäuse wurden in Makrolonkäfigen gehalten, wobei die Besatzdichte 8 Tiere pro Käfig (Bodenfläche ca 400 cm^2) betrug. Die Käfige befanden sich in gut belüfteten Räumen mit konstanter Temperatur von 22°C bis 24°C und einer relativen Feuchtigkeit von 50 - 65%, in denen die Tiere täglich 12 Stunden unter Tageslicht standen.

Als Futter wurde ausschließlich die Altromin^R-Standarddiät der Fa. Altrogge, Lage (Lippe) als Normaldiät verabreicht, dazu reines Wasser ohne irgendwelche Zusätze.

Infiziert wurden männliche und weibliche Mäuse im Alter von sechs bis zehn Wochen durch eine intraperitoneale Inokulation von parasitenhaltigem Blut - frei von Bartonellen (KRETSCHMAR, 1963 b) - , das mit physiologischer Kochsalzlösung und Natriumcitrat verdünnt wurde. Auf eine

genaue Bestimmung der im Inokulum enthaltenen Parasitenzahl konnte verzichtet werden, da bereits bei früheren Untersuchungen von KRETSCHMAR und MATTHAEI (1965) festgestellt worden war, daß der Verlauf der Infektion bei dieser Kombination von Parasiten- und Wirtsstamm von der initialen Erregerzahl unabhängig ist.

Applikation: Die Verabreichung der in physiologischer Kochsalzlösung bzw. Olivenöl gelösten und zu untersuchenden Substanzen erfolgte jeweils an 5 aufeinanderfolgenden Tagen vom 5. bis 9. Tag p.i. durch intraperitoneale Injektion.

Messungen: Gewichts- und Temperaturmessungen wurden in der Zeit zwischen zehn und elf Uhr durchgeführt, um die durch den Tagesrythmus der Maus verursachten Schwankungen weitgehend auszuschalten. Die Messungen der Körpertemperatur erfolgte rektal über ein Thermoelement mit elektrischer Anzeige und einer Ablesegenauigkeit von + 0,1 °C. Gemessen wurde täglich über einen Zeitraum von insgesamt 15 Tagen. Jeweils am 5., 10. und 15. Tag p.i. wurden zur Bestimmung des Hämoglobingehaltes und zur Auszählung der Erythrozyten jeder Maus eine geringe Menge Blut (0,006 ml) entnommen.

Die Auszählung der Erythrozyten und die kolorimetrische Bestimmung des Hämoglobingehaltes wurden nach den üblichen Methoden durchgeführt. Zur quantitativen Beurteilung der

Parasitämie wurden in den nach Giemsa gefärbten Blutausstrichen jeweils mindestens 400 Blutkörperchen ausgezählt.

Zur Auswertung der Messungen wurden das Additionsverfahren angewandt und zu den sich für die einzelnen Tage p.i. ergebenden Mittelwerten ($\bar{x}$) die Standardabweichung (S_d) und der mittlere Fehler des Mittelwertes ($s_{\bar{x}}$) berechnet. Für eine übersichtlichere graphische Darstellung der Körpertemperatur wurden die für jeden Tag p.i. erhaltenen Werte in Klassen zusammengefaßt. Dabei umfasst eine Klasse zwei Tage und wird mit der höheren Tageszahl bezeichnet. Die Berechnung der Wahrscheinlichkeit (p), mit der sich unter der zu prüfenden Hypothese das Versuchsergebnis oder ein noch unwahrscheinlicheres als zufällig ergeben würde, erfolgte bei den Meßreihen nach dem Prüfverfahren von Student (t-Test).

B. Chemotherapeutische Untersuchungen

1. Zur Versuchsanordnung und Durchführung

Untersucht werden im folgenden der Einfluß der Präparate in verschiedenen Kombinationen und Konzentrationen auf die Parasitämie, die Körpertemperatur, die Hämoglobinwerte und die Überlebensdauer der mit Plasmodium berghei infizierten NMRI-Mäuse (insgesamt 296 Tiere). Als Kontrollwerte dienen die zur gleichen Zeit an 4 x 8 infizierten und nicht

behandelten NMRI-Mäusen unter sonst analogen Bedingungen gewonnenen Ergebnisse. Da sich innerhalb dieser 4 Kontrollgruppen keine signifikanten Unterschiede der Messwerte ergaben, konnten sie zusammengefaßt werden und sind als "Kontrolle" bei jeder Versuchsreihe angeführt.

Bei allen Versuchen wurde die Rektaltemperatur täglich registriert, denn unter den zahlreichen Kriterien für eine chemotherapeutische Wirksamkeit ist, wie JACOBI (1965) nachwies, die Überlebenshäufigkeit der malariakranken Mäuse ein relativ ungenaues Maß für die Bewertung der Schwere der Infektion. Wird durch die Therapie die Parasitämie herabgedrückt, ohne ganz beseitigt zu werden, so kann es zu Frührezidiven kommen, die bei tödlichem Ausgang den mittleren Wert für die Überlebenszeit verfälschen. Andererseits erwirbt die Maus nach einer etwa 4 Wochen persistierenden Infektion eine schützende Immunität, die - auch ohne Einfluß des Medikamentes - eine spontane Ausheilung ermöglicht, so daß eine einwandfreie Bewertung des Therapieerfolges nach mehrwöchigem Infektionsverlauf nicht mehr gegeben ist.

Dagegen erweist sich die mittlere Körpertemperatur als ziemlich genauer Indikator des aktuellen Krankheitszustandes. Nach Untersuchungen von KRETSCHMAR (1961) über den Temperaturverlauf bei gesunden und mit P. berghei infizierten NMRI-Mäusen besteht ein Zusammenhang

zwischen dem Stadium der Infektion und der Körpertemperatur. Bereits am 4. Tag p.i., deutlicher jedoch nach dem 8. Tag p.i. sinkt diese tief unter den Normalbereich.

An diesem Temperaturabfall lassen sich noch vor dem Auftreten äußerer Symptome (Apathie, anämischer Habitus) die ersten Auswirkungen der Infektion erkennen. Ein rasches Absinken der Temperatur um 2 bis 3°C innerhalb der ersten Tage p.i. ist ein prognostisch sehr ungünstiges Zeichen und deutet auf den baldigen Tod des Tieres. Ein derartiger Verlauf findet sich beispielsweise bei sehr jungen Tieren oder aber als Folge toxischer Nebenwirkungen des zu prüfenden Pharmakons. Zeigt die Temperaturkurve am 10. bis 15. Tag p.i., d.h. nach Absetzen der Therapie, keine Aufwärtstendenz, dann ist ebenfalls nicht mit einer befriedigenden Ausheilung des Kollektivs zu rechnen.

Jeweils am 5., 10. und 15. Tag p.i. wurde den Tieren Blut abgenommen, um mit der photometrischen Bestimmung des Hämoglobingehalts und der Auszählung der Parasitämie Messwerte für die Anämie zu gewinnen, die das Krankheitsbild der mit P. berghei infizierten Maus bestimmt. Obwohl die Höhe der Parasitämie beim einzelnen Tier nicht unbedingt proportional der äusseren Symptomatik sein muss - eine hochgradig parasitierte Maus braucht nicht zwangsläufig kachektisch oder kurz vor dem Exitus zu sein oder umgekehrt - lassen die Mittelwerte einer grösseren Zahl von Tieren doch eine Parallelität erkennen. Da ausserdem der Prozentsatz von jugendlichen (poly-

chromatischen) Erythrozyten auf das Ausmass der Blutregeneration schliessen lässt und bei dieser Kombination von Erreger- und Versuchstierstamm - infolge der Bevorzugung jugendlicher Erythrozyten durch die Plasmodien (KRETSCHMAR, 1961) - den Grad der Parasitämie mit bestimmt, wurden im Blutbild die befallenen und nicht befallenen Erythrozyten getrennt nach jugendlichen und erwachsenen Formen ausgezählt.

2. Zur Chemotherapie mit Terramycin

Die maximal tolerierte Dosis an Terramycin wurde von THURSTON 1953 mit 3 mg/20 g Maus angegeben. Nach eigenen Beobachtungen wurden von Terramycin noch 10 mg/20 g-NMRI-Maus vertragen. Dabei bekamen jedoch 50% des Kollektivs vorübergehend Lähmungserscheinungen und Krämpfe. Die niedrigste Konzentration im Versuch ist so gewählt, daß sie ungefähr der maximalen peroralen Dosis beim Menschen entspricht. Eine niedrigere Terramycindosis zeigt nach THURSTON (1953) keinerlei therapeutischen Einfluß mehr (dazu muß allerdings angeführt werden, daß THURSTON nicht mit genetisch homogenen Mäusen arbeitete).

a) Versuch Terramycin I, Terramycin II und Terramycin III

aa) Körpertemperatur (Tab. 1, Abb. 1)

Die eigenen Messungen an gesunden Tieren des Stammes NMRI ergeben eine durchschnittliche Körpertemperatur (rektal gemessen) von 37,8°C bei einer Streuung von 0,3°. Im

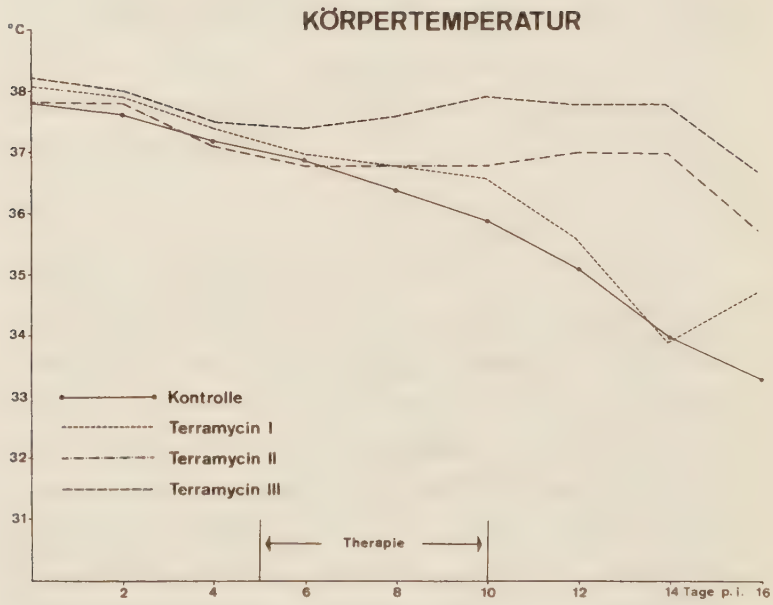
Tab. 1

Körpertemperatur in °C

Tage p.i.		0	2.	4.	6.	8.	10.	12.	14.	16.
Kontrolle	$\bar{x}$	37,8	37,6	37,2	36,9	36,4	35,9	35,1	34,0	33,3
	$s_{\bar{x}}$	± 0,1	± 0,1	± 0,1	± 0,1	± 0,1	± 0,1	± 0,2	± 0,2	± 0,3
	N	(32)	(64)	(64)	(64)	(60)	(60)	(48)	(36)	(14)
Terramycin I 33,3 mg/kg	$\bar{x}$	38,1	37,9	37,4	37,0	36,8	36,6	35,6	33,9	34,7
	$s_{\bar{x}}$	± 0,1	± 0,1	± 0,1	± 0,3	± 0,2	± 0,2	± 0,2	± 0,4	± 0,3
	N	(24)	(48)	(48)	(46)	(44)	(44)	(44)	(32)	(25)
Terramycin II 66,6 mg/kg	$\bar{x}$	37,8	37,8	37,1	36,8	36,8	36,8	37,0	37,0	35,7
	$s_{\bar{x}}$	± 0,1	± 0,1	± 0,1	± 0,2	± 0,1	± 0,1	± 0,3	± 0,3	± 0,5
	N	(24)	(48)	(48)	(48)	(48)	(45)	(42)	(40)	(32)
Terramycin III 100 mg/kg	$\bar{x}$	38,2	38,0	37,5	37,4	37,6	37,9	37,8	37,3	36,7
	$s_{\bar{x}}$	± 0,1	± 0,1	± 0,1	± 0,2	± 0,1	± 0,2	± 0,1	± 0,2	± 0,9
	N	(24)	(48)	(48)	(47)	(45)	(44)	(43)	(42)	(41)

Mittlere Körpertemperatur der mit Plasmodium berghei infizierten Mäuse nach Behandlung mit Terramycin in abgestufter Dosierung.

Abbildung 1



Mittlere Körpertemperatur der mit Plasmodium berghei infizierten Mäuse nach Applikation von 33,3 mg Terramycin (I), 66,6 mg Terramycin (II) und 100 mg Terramycin (III)/kg

Verlaufe der Infektion sinkt die Temperatur fortlaufend ab. So ist sie bei den Kontrolltieren im Mittel am 6. Tag p.i. um 0,9°, am 10. Tag p.i. um 1,6° und am 16. Tag p.i. um 4,5°C abgesunken.

Wie aus Abb. 1 ersichtlich ist, sind sich die negativen Tendenzen der vier Kurven bis zum 6. Tag p.i. ähnlich, d.h. es erfolgt innerhalb dieses Zeitraumes in allen Fällen ein Temperaturrückgang von ca 1°C. Erst bei Terramycin II kommt es jedoch zu einem flachen Anstieg, der am 10. Tag p.i. gegenüber der Kontrollkurve mit $p < 0,01$ statistisch gesichert ist.

Bei Terramycin I hält sich die Körpertemperatur nur während der Therapiedauer, fällt jedoch nach dem 10. Tag p.i. analog der Kontrollkurve rapide ab. Die mittlere Überlebenszeit beträgt in beiden Fällen 15,8 Tage. Mit einer Dosis von 33,3 mg Terramycin / kg Maus lässt sich also, abgesehen von einem leicht mitigierenden Effekt während der Therapiedauer, kein therapeutischer Einfluß auf den weiteren Infektionsverlauf erzielen.

Die Unterschiede der Kurven Terramycin II und Terramycin III sind bezüglich der Kontrollkurve vom 12. bis 16. Tag p.i. an mit $p < 0,001$ hoch gesichert. Ein positiver Einfluß einer Terramycintherapie ist also bei Dosen von 66,6 bzw. 100 mg/kg gegeben. Der Kurvenabfall von Terramycin II und Terramycin III am 12. - 14. Tag p.i. beginnt jeweils unterhalb der Ausgangstemperatur und deutet damit auf eine Reaktivierung

der Infektion, was sich schließlich auch in der Überlebensquote der therapierten Mäuse ausdrückt (Terramycin II = 3/24; Terramycin III = 9/24).

bb) Hämoglobingehalt (Tab. 2, Abb. 2)

Nach der Behandlung, am 10. Tag p.i., liegen die Hämoglobinwerte für Terramycin II und III ungefähr in gleicher Höhe und um etwa 5 g% über der Kontrolle ($p < 0{,}001$). Obwohl es nur bei Terramycin III zu einem Anstieg des Hämoglobingehalts im Blut nach der Behandlung kommt, ist für beide Dosierungen der Unterschied zur Kontrolle am 15. Tag p.i. signifikant ($p < 0{,}01$ für Terramycin II; $p < 0{,}001$ für Terramycin III).

Für Terramycin I ist dagegen ein gesicherter therapeutischer Effekt anhand der Hämoglobinwerte nicht nachzuweisen.

cc) Parasitämie (Tab. 3)

Vergleicht man die Parasitämiewerte der behandelten Tiere mit denen der Kontrolle, dann fällt auf, daß bei Terramycin I nach einer kurzdauernden Senkung der Parasitämie am 10. Tag p.i. diese am 15. Tag p.i. bereits wieder in einen Bereich kommt, in dem sie sich nicht mehr signifikant von der Kontrolle unterscheidet. Terramycin II und Terramycin III unterscheiden sich dagegen am 10. Tag p.i. signifikant von der Kontrolle ($p < 0{,}001$), jedoch gelingt es auch bei Terramycin III nicht, völlige Parasitenfreiheit zu erzielen.

Tab. 2

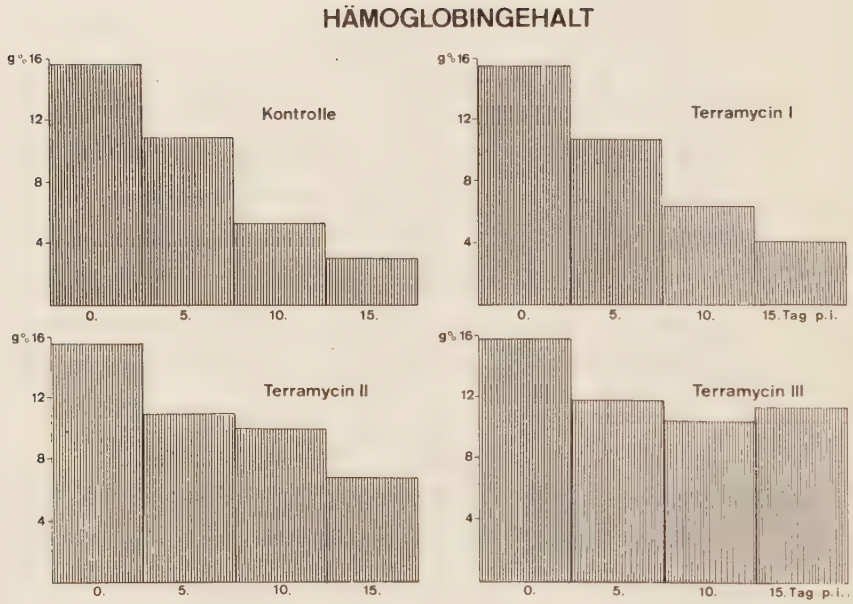
Hämoglobingehalt in g %

	N	Kontrolle	N	Terramycin I	N	Terramycin II	N	Terramycin III
am 0. Tag p.i.	32	15,6 ± 0,2	24	15,5 ± 0,3	24	15,8 ± 0,3	24	15,8 ± 0,2
am 5. Tag p.i.	32	10,9 ± 0,4	23	10,8 ± 0,5	24	11,0 ± 0,4	24	11,8 ± 0,4
am 10. Tag p.i.	30	5,3 ± 0,5	22	6,5 ± 0,5	22	10,0 ± 0,4	23	10,5 ± 0,3
am 15. Tag p.i.	14	3,1 ± 0,8	14	4,2 ± 0,6	20	6,8 ± 0,7	21	11,4 ± 0,4

Angegeben sind der Mittelwert $\bar{x}$ und sein mittlerer Fehler $s_{\bar{x}}$

Mittlerer Hämoglobingehalt der mit Plasmodium berghei infizierten Mäuse nach Applikation von 33,3 mg Terramycin (I), 66,6 mg Terramycin (II) und 100 mg Terramycin (III)/kg

A b b i l d u n g 2



Mittlerer Hämoglobingehalt der mit Plasmodium berghei infizierten Mäuse nach Applikation von 33,3 mg Terramycin (I), 66,6 mg Terramycin (II) und 100 mg Terramycin (III)/kg

Parasitämie in %

	N	Kontrolle	N	Terramyc. I	N	Terramyc. II	N	Terramyc. III
Parasitierte erw. Erythrozyten (%)								
am 5. Tag p.i.	32	3,8 ± 0,4	23	3,8 ± 0,4	24	6,2 ± 1,1	24	2,7 ± 0,5
am 10. Tag p.i.	30	1,4 ± 0,2	22	1,1 ± 0,3	22	1,4 ± 0,4	23	0,05 ± 0,2
am 15. Tag p.i.	14	1,1 ± 0,5	14	6,0 ± 1,8	20	7,0 ± 1,7	21	2,3 ± 1,2
Parasitierte polychrom. Erythrozyten (%)								
am 5. Tag p.i.	32	78,4 ± 3,5	23	91,2 ± 2,7	24	87,0 ± 3,2	24	73,2 ± 6,7
am 10. Tag p.i.	30	94,2 ± 1,6	22	55,9 ± 3,2	22	11,1 ± 4,9	23	0,2 ± 0,2
am 15. Tag p.i.	14	89,8 ± 2,7	14	75,1 ± 8,3	20	60,4 ± 9,6	21	18,8 ± 7,6
Gesamt-Parasitämie (%)								
am 5. Tag p.i.	32	5,6 ± 0,3	23	4,9 ± 0,6	24	7,5 ± 0,9	24	3,9 ± 0,3
am 10. Tag p.i.	30	22,8 ± 1,6	22	12,5 ± 1,6	22	3,8 ± 1,5	23	0,09 ± 0,08
am 15. Tag p.i.	14	38,2 ± 2,4	14	39,4 ± 6,4	20	27,2 ± 5,4	21	4,4 ± 6,3
Polychromasie (%)								
am 5. Tag p.i.	32	2,4 ± 0,1	23	1,4 ± 0,2	24	1,6 ± 0,4	24	1,6 ± 0,3
am 10. Tag p.i.	30	23,0 ± 1,7	22	21,6 ± 1,8	22	21,7 ± 1,8	23	15,7 ± 2,2
am 15. Tag p.i.	14	42,9 ± 3,4	14	43,7 ± 4,5	20	30,9 ± 3,9	21	15,1 ± 1,5

Angegeben sind der Mittelwert $\bar{x}$ und sein mittlerer Fehler $s_{\bar{x}}$

Mittelwert der Parasitämie der mit Plasmodium berghei infizierten Mäuse nach Applikation von 33,3 mg Terramycin (I), 66,6 mg Terramycin (II) und 100 mg Terramycin (III)/kg

Tab. 3

Negativ verlaufende Reinfektionsversuche nach zwei Monaten an den neun überlebenden Mäusen des Terramycin III-Versuches bestätigen die von KRETSCHMAR (1962, 1965, 1966 b) gemachte Beobachtung, daß auch eine niedrige Parasitämie zum Erwerb einer schützenden Immunität ausreicht, sofern die Plasmodien länger als 14 Tage im Blut persistieren.

Die Veränderungen im Blutbild als Folge der Parasitämie und der daraus resultierenden Anämie äußern sich besonders in einem Anstieg der polychromatischen Erythrocyten als Ausdruck eines erhöhten Nachschubs aus dem erythropoetischen System (KRETSCHMAR, 1961). Während sich die Werte für die Polychromasie am 5. und 10. Tag p.i. innerhalb der obigen vier Gruppen praktisch kaum unterscheiden, werden am 15. Tag p.i. doch Unterschiede deutlich, indem mit steigender Terramycinkonzentration (33,3; 66,6 u. 100 mg/kg) die Polychromasie entsprechend linear abnimmt (43,7%; 30,9% u. 15,1%). Andrerseits nimmt mit der Höhe der Terramycindosierung die parasitäre Befallsquote der polychromatischen Erythrocyten ebenfalls ab (10. Tag p.i.: 55,9; 11,1 u. 0,2%). Eine ähnliche Beobachtung machte JACOBI (1962) mit steigenden Chininkonzentrationen. Die reifen Erythrocyten sind am 10. Tag p.i. in allen Gruppen nur zu maximal 1,5% parasitiert.

Die Stärke des Wiederaufflackerns der Infektion am 15. Tag p.i. als Funktion der Terramycindosierung läßt sich sehr gut an den Prozentzahlen der parasitierten polychromatischen

Erythrozyten ablesen. Je niedriger die Dosierung gewählt wird, desto höher liegt der entsprechende Befallswert (Terramycin I, II u. III: 75,8%; 60,4% u. 18,8%). Die ebenfalls dosisabhängige Polychromasie zeigt am 15. Tag p.i. mit ihrem deutlichen Anstieg gegenüber dem 10. Tag p.i., daß die Infektion und damit die Blutzerstörung zumindest bei Terramycin I und Terramycin II reaktiviert wird. Mit einer gewissen Vorsicht läßt sich also der Zustand des polychromatischen Blutbildanteiles als grober Maßstab für die Beurteilung eines Chemotherapeutikums heranziehen.

dd) Diskussion der Ergebnisse

Ein vergleichender Überblick über die Ergebnisse der Terramycintherapie bei der P. berghei-Infektion führt zu folgendem Resultat: Für die Mäusegruppen Terramycin I, II und III bestehen am 10. Tag p.i. bezüglich der Gesamtparasitämie statistisch hoch gesicherte Differenzen zur Kontrolle ($p < 0{,}001$). Für die Mäusegruppe Terramycin III gilt diese Sicherung gegenüber der Kontrolle auch noch am 15. Tag p.i. Bei dieser Gruppe hat sich unter der Wirkung der Chemotherapie das Blutbild eindeutig gebessert, ebenso konnten der Hämoglobin- und Temperaturabfall aufgefangen werden.

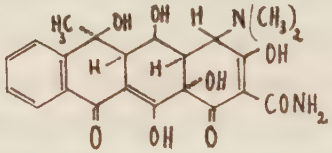
Die Brauchbarkeit eines Heilmittels wird von einigen Autoren (vgl. SCHNITZER und HAWKING) dann als genügend erachtet, wenn am Ende der Therapie nicht mehr als 1% der Erythrozyten parasitiert sind. Andere Autoren dagegen begnügen sich mit einer 75%igen

Reduktion in Bezug auf die Kontrollen. Beide Bedingungen sind bei Terramycin III am 10. Tag p.i. hinreichend erfüllt. Wegen der hohen Streuung bei Versuchen mit Mäusen ist jedoch die statistische Sicherung vorzuziehen. Tetracycline, speziell das in der vorliegenden Versuchsserie verwandte Terramycin, sind also entgegen den Beobachtungen von BOX et al. (1954) durchaus wirksame Therapeutika bei der Behandlung der P. berghei-Infektion.

Im folgenden soll neben der Skizzierung einer tabellarischen Übersicht (HEILMEYER, Antibiotica-Fibel) noch auf den Wirkungsmechanismus der Tetracycline eingegangen werden.

b) Hauptcharakteristika des Terramycins

Strukturformel:



Mol. Gewicht:	460
Löslichkeit:	Die Wasserlöslichkeit der freien Base ist gering; sie beträgt etwa 0,6 - 1,8 mg/ml. Hydrochloride lösen sich zu 6,9 mg/ml. pH der Lösung 2 - 3.
Haltbarkeit:	Bei pH 2,5 und Temperaturen 22°C praktisch unbegrenzt haltbar.
Hemmkonzentration:	Mycobacterium tuberculosis 4-16 γ/ml.
Wirkungstyp:	Bakteriostase

Resistenz:	Langsame Resistenzentwicklung.
Eiweißbindung:	Bei Serumwerten von 5-10 γ/ml ist Terramycin zu 21-24% an Eiweiß gebunden.
Therapeutische Serumkonzentration:	0,5 - 6 γ/ml.
Halbwertszeit:	Nach intravenöser oder intramuskulärer Applikation 8-9 Stunden.
Ausscheidung:	Tetracycline werden vorwiegend durch glomeruläre Filtration eliminiert.
Abbau:	In etwa 30-50% zu inaktiven Metaboliten.
Tagesdosierung bei Erwachsenen:	Optimal 1,5 - 3,0 g Minimal 1,0 - 1,5 g Maximal 3,0 - 5,0 g

c) Zum Wirkungsmechanismus der Tetracycline

Tetracycline wirken in den üblichen therapeutischen Konzentrationen bakteriostatisch. Dabei ist die Wirkung bei proliferierenden Keimen zuverlässiger als im Ruhestadium. Ein langsamer bakterizider Effekt kann bei 30 bis 300 facher Erhöhung der Hemmwerte in vitro bei proliferierenden Keimen beobachtet werden. Extra- und intrazellulär gelagerte Bakterien werden gleichermaßen erreicht. Diese Tatsache wurde experimentell bei Tuberkelbakterien nachgewiesen und weiter klinisch bei Infektionen mit Brucellen, Rickettsien und den großen Viren bestätigt.

Das Wirkungsoptimum liegt bei den gebräuchlichsten Tetracyclinen in einem pH-Bereich von 6,1 bis 6,8. Tetracycline besitzen eine ähnliche allgemeine Hemmwirkung auf die Protein-

synthese wie beispielsweise Chloramphenicol. In bakteriostatischen Konzentrationen unterdrücken sie die Bildung adaptiver Enzyme (BENIGNO et al., 1955; BERNHEIM, 1957) sowie den mit der Proteinsynthese verbundenen Einbau von Aminosäuren. Die Verhältnisse sind aber nicht besonders übersichtlich, weil bereits in 100-fach bakteriostatischen Konzentrationen Seiteneffekte, wie Hemmung der Gärung, des Glutaminsäuretransportes, der Nukleinsäuresynthese u.a. deutlich werden.

Diese Effekte haben wohl mehr mit der Toxizität als mit der antibiotischen Aktivität der Tetracycline zu tun. Wahrscheinlich lassen sie sich völlig aus ihrer hohen Affinität zu Schwermetallionen erklären. Sämtliche Antibiotika der Tetracyclingruppe bilden stabile Chelate mit vielen biologisch wichtigen Metallionen, deren Stabilität in folgender reihenfolge abnimmt: Fe^{3+}, Al^{3+}, Cu^{++}, Ni^{++}, Fe^{++}, Co^{++}, Zn^{++} und Mn^{++} (ALBERT und REES, 1956). Ob diese Komplexbildung mit Ionen bei der antibakteriellen Aktivität eine Rolle spielt, ist noch nicht gesichert. Bekannt ist jedoch, daß Enzymsysteme, die für ihre Aktivität Metallionen benötigen, dadurch gehemmt werden.

Die Hemmwirkung kann durch Zusatz der entsprechenden Metallionen aufgehoben werden (WEINBERG, 1957). Eine zweifellos auf Bindung von Mn^{++} beruhende Enzymhemmung bei Bakterien wurde untersucht, doch sind die Anhaltspunkte für ihre antibiotische Bedeutung indirekter Natur (SAZ und SLIE, 1953).

3. Zur Chemotherapie mit Terramycin und Paraaminosalicylsäure

Das Tuberkulostatikum Paraaminosalicylsäure (PAS) wurde 1953 von THURSTON erfolglos an einer P. berghei-Infektion erprobt. Die für diese Verbindung von THURSTON angegebene Dosis letalis betrug 4 mg/20 g Maus. In eigenen Versuchen an NMRI-Mäusen wurden jedoch 25 mg PAS in Form des Na-Salzes noch gut vertragen.

Da PAS und Terramycin an verschiedenen Stellen im Parasitenstoffwechsel angreifen, lag der Gedanke nahe, auf eine mögliche Summierung stoffwechselschädigender Potenzen zu prüfen. Diese Untersuchung erfolgte an zwei Mäusegruppen in der Weise, daß einmal eine niedrige Terramycindosis (Terramycin I = 33,3 mg/kg) mit der auf den Menschen bezogenen Maximaldosis an PAS (750 mg/kg) und umgekehrt eine hohe Terramycindosis (Terramycin III = 100 mg/kg) mit der entsprechenden therapeutischen Minimaldosis an PAS (150 mg/kg) kombiniert wurde.

Dabei ergab sich folgendes Bild:

a) Versuch Terramycin I + 750 mg/kg PAS und
Terramycin III + 150 mg/kg PAS

aa) Körpertemperatur (Tab. 4, Abb. 3)

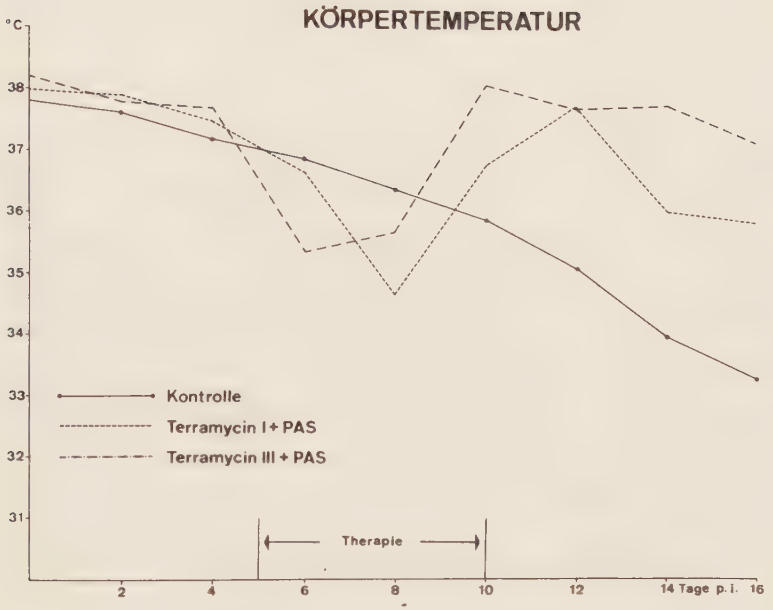
Der Temperaturverlauf von Terramycin I/PAS und Terramycin III/PAS folgt bis zum 6. Tag p.i. in seiner abfallenden Charakteristik in sehr ähnlicher Weise dem äußeren Bild der Abb. 1. Am 6., bzw. am 8. Tag p.i. jedoch sinken die

Tab. 4

Tage p.i.		Körpertemperatur in °C 0	2.	4.	6.	8.	10.	12.	14.	16.
Kontrolle	$\bar{x}$	37,8	37,6	37,2	36,9	36,4	35,9	35,1	34,0	33,3
	$s_{\bar{x}}$	± 0,1	± 0,1	± 0,1	± 0,1	± 0,1	± 0,1	± 0,2	± 0,2	± 0,3
	N	(32)	(64)	(64)	(64)	(60)	(60)	(48)	(36)	(14)
Terramycin I + PAS 33,3 mg/kg + 750 mg/kg	$\bar{x}$	38,0	37,9	37,5	36,7	34,7	36,8	37,8	36,1	35,9
	$s_{\bar{x}}$	± 0,2	± 0,1	± 0,1	± 0,3	± 0,2	± 0,3	± 0,1	± 0,5	± 0,3
	N	(24)	(24)	(48)	(45)	(43)	(21)	(42)	(41)	(23)
Terramycin III + PAS 100 mg/kg + 150 mg/kg	$\bar{x}$	38,2	37,8	37,7	35,4	35,7	38,1	37,7	37,8	37,2
	$s_{\bar{x}}$	± 0,1	± 0,2	± 0,1	± 0,5	± 0,3	± 0,3	± 0,4	± 0,2	± 0,2
	N	(24)	(24)	(48)	(48)	(47)	(22)	(44)	(44)	(22)

Mittlere Körpertemperatur der mit Plasmodium berghei infizierten Mäuse nach Applikation von 33,3 mg Terramycin (I) + 750 mg PAS/kg, sowie von 100 mg Terramycin (III) + 150 mg PAS/kg

A b b i l d u n g 3



Mittlere Körpertemperatur der mit Plasmodium berghei infizierten Mäuse nach Applikation von 33,3 mg Terramycin (I) + 750 mg PAS/kg, sowie von 100 mg Terramycin (III) + 150 mg PAS/kg

Temperaturkurven deutlich unter das Niveau der Kontrollkurve. Für Terramycin III/PAS ist diese Abweichung am 6. Tag p.i. und für Terramycin I/PAS am 8. Tag p.i. mit $p < 0{,}001$ hoch gesichert. Dieselbe Sicherung gilt für den am 10. bis 12. Tag p.i. erfolgten Wiederanstieg der beiden Kurven.

Der anfänglich abfallende Temperaturverlauf während der Therapiedauer läßt auf einen kurzen toxischen Schub schliessen, der jedoch rasch aufgefangen wird und sich auch bei weiterer PAS-Zufuhr nicht mehr wiederholt. Am 12. Tag p.i. sind für beide Gruppen die Ausgangstemperaturen in Annäherung wieder erreicht. Dasselbe galt ja auch für Versuch Terramycin III (Abb. 1). Daß die erreichte Höhe nicht gehalten wird, liegt wie bei den früheren Versuchen an den z.T. wieder auftretenden Rezidiven.

bb) Hämoglobingehalt (Tab. 5, Abb. 4)

Sowohl bei Behandlung mit Terramycin I + PAS als auch Terramycin III + PAS ist die Erhöhung der Hb-Werte am 10. auf das Doppelte und 15. Tag p.i. auf das 3- bis 4-fache der Kontrolle ein signifikanter Hinweis ($p < 0{,}001$) auf den Therapieerfolg.

Gewisse Unterschiede zeigen sich auch gegenüber den reinen Terramycinversuchen (Abb. 2). Die Differenz im Hb-Gehalt des Blutes bei Behandlung mit Terramycin I + PAS am 15. Tag p.i. (9,2 g%) und Terramycin I allein am 15. Tag p.i.

Tab. 5

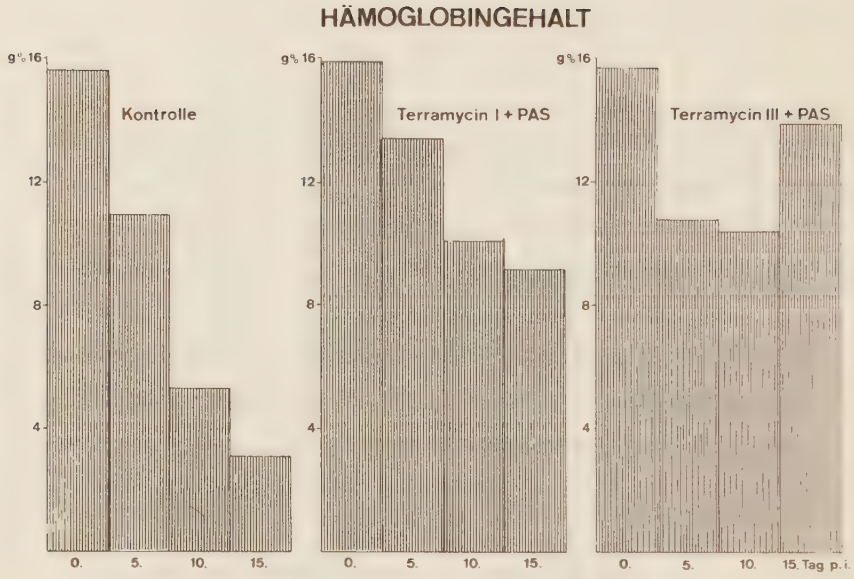
Hämoglobingehalt in g %

	N	Kontrolle	N	Terramycin I + PAS	N	Terramycin III + PAS
am 0. Tag p.i.	32	15,6 ± 0,2	24	15,9 ± 0,3	24	15,7 ± 0,2
am 5. Tag p.i.	32	10,9 ± 0,4	23	11,4 ± 0,4	24	10,8 ± 0,3
am 10. Tag p.i.	30	5,3 ± 0,5	21	10,1 ± 0,4	22	10,4 ± 0,3
am 15. Tag p.i.	14	3,1 ± 0,8	20	9,2 ± 0,5	22	13,9 ± 0,4

Angegeben sind der Mittelwert $\bar{x}$ und sein mittlerer Fehler $s_{\bar{x}}$

Mittlerer Hämoglobingehalt der mit Plasmodium berghei infizierten Mäuse nach Applikation von 33,3 mg Terramycin (I) + 750 mg PAS/kg, sowie von 100 mg Terramycin (III) + 150 mg PAS/kg

A b b i l d u n g 4



Mittlerer Hämoglobingehalt der mit Plasmodium berghei infizierten Mäuse nach Applikation von 33,3 mg Terramycin (I) + 750 mg PAS/kg, sowie von 100 mg Terramycin (III) + 150 mg PAS/kg

(4,2 g%) ist mit $p < 0,001$ hoch gesichert. Dagegen ist die Hb-Konzentration bei Behandlung mit Terramycin III + PAS am 15. Tag p.i. (13,9 %) gegenüber der entsprechenden Hb-Konzentration bei Terramycin III allein (11,4 %) mit $p < 0,05$ nicht signifikant verschieden.

cc) Parasitämie (Tab. 6)

Unter der Einwirkung von Terramycin I + PAS ist die Parasitämie am 10. Tag p.i. mit 1,2 % äußerst gering und selbst am 15. Tag p.i. liegt sie noch um 50 % niedriger als bei der Kontrolle. Bei der Behandlung mit Terramycin III + PAS können am 10. Tag p.i. keine Erreger im Blutausstrich mehr nachgewiesen werden. Daß dennoch der Organismus nicht vollständig von ihnen befreit ist, beweist die am 15. Tag p.i. zwar geringfügige aber immerhin evidente Parasitämie von 1,5 %.

Die Unterschiede in der Parasitämie bei Behandlung mit Terramycin I + PAS und mit Terramycin I allein (Abb. 3) sind für den 10. und 15. Tag p.i. hoch gesichert ($p < 0,001$). Dagegen ergeben sich für Terramycin III + PAS und Terramycin III allein am 10. Tag p.i. (0,0 % und 0,09 %) sowie am 15. Tag p.i. (1,5 % und 4,4 %) keine signifikanten Abweichungen.

Die differenzierte Auswertung der Parasitämie ergibt einige weitere Aufschlüsse: Der Rückgang der Polychromasie bei Terramycin I + PAS und Terramycin III + PAS am 15. Tag p.i.

Tab. 6

Parasitämie in %

	N	Kontrolle	N	Terramyc. I + PAS	N	Terramyc. III + PAS
Parasitierte erw. Erythrozyten (%)						
am 5. Tag p.i.	32	3,8 ± 0,4	23	5,4 ± 1,0	24	5,8 ± 1,2
am 10. Tag p.i.	30	1,4 ± 0,2	21	2,0 ± 1,1	22	0,0 ± 0,0
am 15. Tag p.i.	14	1,1 - 0,5	20	12,0 - 4,0	22	0,6 - 0,5
Parasitierte polychrom. Erythrozyten (%)						
am 5. Tag p.i.	32	78,4 ± 3,5	23	99,2 ± 0,8	24	99,3 ± 0,6
am 10. Tag p.i.	30	94,2 ± 1,6	21	0,0 ± 0,0	22	0,0 ± 0,0
am 15. Tag p.i.	14	89,8 ± 2,7	20	40,8 ± 9,0	22	6,0 ± 4,3
Gesamt-Parasitämie (%)						
am 5. Tag p.i.	32	5,6 ± 0,3	23	6,2 ± 0,9	24	6,5 ± 1,1
am 10. Tag p.i.	30	22,8 ± 1,6	21	1,2 ± 1,9	22	0,0 ± 0,0
am 15. Tag p.i.	14	38,2 ± 2,4	20	16,7 ± 4,3	22	1,5 ± 1,3
Polychromasie (%)						
am 5. Tag p.i.	32	2,4 ± 0,1	23	0,8 ± 0,2	24	0,7 ± 0,2
am 10. Tag p.i.	30	23,0 ± 1,7	21	31,3 ± 2,7	22	25,7 ± 2,9
am 15. Tag p.i.	14	42,9 ± 3,4	20	13,8 ± 1,8	22	19,6 ± 2,3

Angegeben sind der Mittelwert $\bar{x}$ und sein mittlerer Fehler $s_{\bar{x}}$

Mittelwert der Parasitämie der mit Plasmodium berghei infizierten Mäuse nach Applikation von 33,3 mg Terramycin (I) + 750 mg PAS/kg, sowie von 100 mg Terramycin (III) + 150 mg PAS/kg

(31,3 auf 13,8 % und 25,7 auf 19,6 %) läßt auf einen kurativen Effekt schließen, andernfalls hätten - wie bei den Versuchen Terramycin I und II - die entsprechenden Werte nach oben tendiert (43,7 % und 30,9 %).

Während die Befallsquote der Reticulocyten bei Terramycin I und Terramycin III am 10. Tag p.i. noch 55,9 bzw. 0,2 % erreicht, können mit PAS-Zusatz am 10. Tag p.i. keine parasitierten Reticulocyten im Blutausstrich mehr nachgewiesen werden. Am 15. Tag p.i. allerdings, also fünf Tage nach Absetzen der Therapie, deutet der erneute Befall der Reticulocyten auf ein Wiederaufflackern der Infektion, die jedoch bei Terramycin I + PAS von 24 Mäusen 9 (= 37,5 %) und bei Terramycin III + PAS von 24 Mäusen 21 (= 87,5 %) überleben läßt. Diese Tiere erwiesen sich alle gegenüber einer Reinfektion als immun.

dd) Bewertung der Ergebnisse

Die Behandlung der Plasmodium berghei-Infektion der Maus mit einer Kombination von Terramycin und PAS ist in ihrem therapeutischen Effekt eindeutig positiv; die Unterschiede gegenüber der Kontrolle sind statistisch gesichert. Ein weiterer Vergleich mit den Therapieversuchen Terramycin I, II und III zeigt, daß zumindest Terramycin I + PAS dem Terramycin I in allen geprüften Qualitäten signifikant überlegen ist. Diese Überlegenheit erstreckt sich auch noch auf die Parasitämie bei Terramycin II, während sich Unter-

schiede in den Hb-Werten statistisch nicht mehr absichern lassen. Die therapeutische Wirksamkeit von Terramycin III wird von Terramycin I + PAS jedoch in keinem Falle mehr erreicht. Die Wirkung hoher Terramycindosen (100 mg/kg) läßt sich durch Zusatz von PAS nur noch geringfügig steigern.

Die an ein Therapeutikum gestellten Forderungen sind bei beiden Versuchsgruppen am 10. Tag p.i. mit 1,2% bzw. 0,0% Parasitämie hinreichend erfüllt. Die bei Terramycin III + PAS über längere Zeit niedrig gehaltene Parasitämie vermag die Abwehrfunktionen schließlich so zu stimulieren, daß es zu keinem ernsthaften Aufflackern der Infektion mehr kommt. Anhand des Beispiels Terramycin I + PAS läßt sich zeigen, daß mindestens 1 Terramycin-Äquivalent (= 33,3 mg, bezogen auf die Versuche Terramycin I, II und III) durch PAS ersetzbar ist, d.h. die therapeutische Wirkung von Terramycin I + PAS entspricht etwa der des Terramycin II.

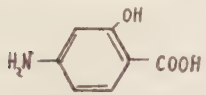
Bei länger dauernden Versuchen mit PAS dürfte mit einem schnellen Wirkungsverlust zu rechnen sein. Es ist denkbar, daß es zu einer vermehrten Bildung von adaptiven Hydroxylasen kommt und zwar im Sinne einer Dehydroxylierung der PAS zum essentiellen Wuchsstoff p-Aminobenzoesäure (PAB). Die Folge wäre eine Wirkungsumkehr. Dieser potentielle Reaktions-

ablauf könnte durch Terramycin in dessen Eigenschaft als Hydroxylasenblocker möglicherweise unterdrückt werden; es käme zur vollen Entfaltung der kompetitiven PAB-Verdrängung und damit zu einer Frühschädigung in der parasitären Synthesekette. Die dadurch gestörte Anlieferung von Nukleinsäurevorstufen würde mit der inhibierenden Interferenz des Terramycins an den nachgeordneten höheren und differenzierteren Schaltstellen im Nukleinsäuresyntheseprozeß zu einer gegen den Parasiten wirksamen Noxe summiert.

Im folgenden soll eine Übersicht über die Hauptcharakteristika der PAS sowie eine weitere Diskussion zum Wirkungsmechanismus gegeben werden.

b) Hauptcharakteristika der Paraaminosalicylsäure

Strukturformel:



Freie PAS: 72,5% des Na-PAS · 2 H_2O
" " : 80,0% " K-PAS

Mol. Gewicht: 153,13; Na-PAS · 2 H_2O : 211,1

Löslichkeit: Wasserlöslichkeit der PAS gering: 1-2 mg/ml
Wasserlöslichkeit des Na-PAS: 500 mg/ml

pH-Werte: pH der 0,1 %igen PAS-Lösung: 3,0 - 3,7
pH " 1,0 %igen Na-PAS- " : 7,0

Haltbarkeit:	In Lösung unter Lichteinfluß und in Abhängigkeit von pH-Werten Zersetzung: (toxisch)
Hemmkonzentrationen:	Mycobacterium tuberculosis: 1 - 2 γ/ml (bei Typ bovinus: 10 - 50 γ/ml)
Wirkungstyp:	Bakteriostase
Wirkungsoptimum:	pH 7,0 - 7,5
Resistenzentwicklung:	Langsam. Nach 3 - (6) Monaten 50 %
Inaktivierung und Antagonisten:	Biotin, Methionin, Panthotensäure, Salicylate, Chelatbildung mit Fe^{++}, Co^{++}, Mn^{++}, Cr^{++}. Kompetitiver Antagonismus zur PAB:
Abbau:	Etwa 75 - 85 % nach oraler Gabe. Hoher Abbau bei niedriger Dosierung und oraler Gabe Geringer Abbau bei hoher Dosierung und Infusion
Serumspiegel:	Nach einmaliger Gabe von 12 - 16 g PAS Serumwerte von 200 - 300 γ/ml. Erst bei Konzentrationen von 100 γ/ml und darüber kann eine therapeutische Wirkung erwartet werden.
Ausscheidung:	Nach oraler Gabe in 2 Stunden: 40 - 50 % " " " 4 - 6 " : 70 - 75 % " " " 24 " : 75 - 80 %
Dosen:	Optimal: 200 - 300 mg/kg Maximal: 750 mg/kg (als Infusion) Minimal: 150 mg/kg

c) Zum Wirkungsmechanismus der p-Aminosalicylsäure

Wie aus der Übersicht hervorgeht, lassen sich der PAS zwei antimikrobielle Aktivitätsprinzipien zugrundelegen, einmal die Chelatbildung und zum anderen der kompetitive Antagonismus zur PAB.

Die Chelat- oder Metallkomplexbildung der PAS (wie auch der Tetracycline) erfüllt zwei Funktionen. Sie bestehen einmal in einem Abfangmechanismus der zu Enzymkatalysen notwendigen Schwermetallionen (wie z.B. das für den Übergang der Fol- in die Folinsäure unentbehrliche Mn^{++}, das-- wie schon ausgeführt - auch von Tetracyclinen gebunden werden kann) und zum anderen in einer durch die Chelatbildung, vor allem mit Cu^{++} und Co^{++}, wesentlich erhöhten Lipoidlöslichkeit. In der Tbc-Therapie erwiesen sich stärker lipoidlösliche PAS-Chelate (FOYE, 1955, 1958, 1961) als weitaus wirksamer.

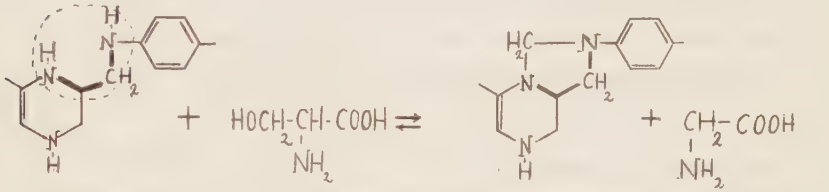
Da verschiedene Befunde darauf hinweisen, daß die PAS in einigen Bakterienarten PAB zu verdrängen vermag, sind die biochemischen Konsequenzen im folgenden zu diskutieren.

Malariaerreger benötigen nach heutiger Auffassung zu ihrer Entwicklung und Vermehrung PAB (vgl. KRETSCHMAR, 1966 a, c). Bereits 1942 wiesen MAIER und RILEY nach, daß sich der Antimalariaeffekt von Sulfonamiden durch den Antagonisten PAB wieder aufheben läßt. Inzwischen konnte durch ausge-

dehnte Versuchsreihen unter standardisierten Bedingungen mit PAB-Mangeldiäten gezeigt werden, daß die PAB für die Vermehrung der Malariaerreger essentiell ist, der sich auch nicht durch seine biochemischen Folgeprodukte, die Fol- oder Folinsäure ersetzen läßt (JACOBS, 1964; KRETSCHMAR, 1966 a; JERUSALEM, 1966). Wahrscheinlich ist speziell im Plasmodienahsuhalt die PAB ein integrierender Bestandteil eines wichtigen, noch unbekannten Fermentes. Wäre hierbei der Cofermент-Anteil ein Folsäureanalogon - also ein Molekül, das zwar PAB enthält, in seinem Pteridin- oder Aminosäureanteil jedoch chemisch variiert - dann würde dies auch die Tatsache erklären, daß die Folsäure-Antagonisten Amethopterin und Pyrimethamin die Plasmodienentwicklung allein nicht nur wenig, sondern bei PAB-Zugabe überhaupt nicht zu hemmen vermögen (JERUSALEM, 1966; KRETSCHMAR, 1966 a). Umgekehrt wird möglicherweise Folsäure bei PAB-Mangeldiät im Sinne einer PAB-Freisetzung metabolisiert.

Im normalen Zellstoffwechsel stellt der Übergang der Folin die Folinsäure bzw. Hydroxymethyl-tetrahydrofolsäure ($N^{10}CH_2OH\text{-}FH_4$) eine wichtige Voraussetzung für die Purin-, Pyrimidin- und Nukleinsäuresynthese dar. Dieser Vorgang erfolgt unter Vit. B_{12}-Katalyse und Übertragung eines sog. C_1-Bruchstückes (vgl. JERUSALEM u. KRETSCHMAR, 1967). Diese C_1-Einheit kann aus Dimethylglycin oder Sarkosin stammen. Die physiologisch wichtigste Quelle ist jedoch

das ß-Kohlenstoffatom des Serins; es entstammt letzten Endes aus den Kohlenstoffatomen 1 und 6 der Glukose. Nach GREENBERG (1955), BLAKLEY (1955), SAKAMI (1955) und JAENICKE (1956, 1957) wird das ß-C-Atom des Serins als Hydroxymethylgruppe auf die Tetrahydrofolsäure übertragen. Katalysator dieser Reaktion ist das Enzym Serin-Hydroxymethylase:



Tetrahydrofolsäure — Serin — Hydroxymethyl-tetrahydrofolsäure — Glycin

Die reversible Umwandlung von Serin und Tetrahydrofolsäure in Hydroxymethyl-tetrahydrofolsäure und Glycin erfordert als weitere Katalysatoren Pyridoxal und Mn^{++}-Ionen (JAENICKE, 1955, 1959).

Das übertragende Prinzip liegt in der Äthylendiamin-Struktur der Tetrahydrofolsäure begründet (BRODE, 1959). Für den üblichen Zellstoffwechsel dürfte sowohl aus sterischen als auch aus thermodynamisch-energetischen Gründen diese im Molekül verankerte Äthylendiamin-Konstellation die optimale Bedingung darstellen. Dies schließt jedoch nicht aus, daß es nun im Plasmodienhaushalt ein noch günstigeres pterinogenes Prinzip gibt, d.h. es ist denkbar, daß sich

die Plasmodien aus energetischen oder sterischen Gründen anderer Äthylendiamin-Derivate zur Übertragung der C_1-Bruchstücke bedienen. Äthylendiamine sind Komplexbildner, d.h. sie können durch Schwermetallionen (z.B. Mn^{++}) in bestimmten räumlichen Anordnungen mehr oder weniger stark fixiert werden. Eine derartige biophysikalische Konstellation läßt sich jedoch durch Zugabe anderer bzw. stärkerer Komplexbildner (Tetracycline, PAS) infolge der nun einsetzenden Ummetallierung beträchtlich stören.

4. Zur Chemotherapie mit Isothiocyanaten

Aus der großen Gruppe genuiner Senföle wurden auf Grund ihrer besseren Reindarstellung und infolgedessen besseren Standardisierungsmöglichkeit die 11 folgenden synthetischen Isothiocyansäureester ausgewählt:

1) $Br-C_6H_4-NCS$ p-Bromphenylisothiocyanat

2) $Br-C_6H_4-CH_2-NCS$ p-Brombenzylisothiocyanat

3) $C_6H_5-C_6H_4-NCS$ Diphenylisothiocyanat

4) $C_{10}H_7-CH_2-NCS$ (1)-Naphthylmethylisothiocyanat

5) $CH_3-SO_2-C_6H_4-NCS$ p-Methylsulfophenylisothiocyanat

6) $C_2H_5-SO_2-C_6H_4-NCS$ p-Äthylsulfophenylisothiocyanat

7) $CH_3(CH_2)_7SO_2C_6H_4NCS$ p-n-Octylsulfophenylisothiocyanat

8) $CH_3-S-C_6H_4-NCS$ p-Methylthiophenylisothiocyanat

9) $C_2H_5-S-C_6H_4-NCS$ p-Äthylthiophenylisothiocyanat

10) $CH_3(CH_2)_7SC_6H_4-NCS$ p-n-Octylthiophenylisothiocyanat

11) $SCN-C_6H_4SO_2-C_6H_4-NCS$ p.p'-Diisocyanatdiphenylsulfon

Sämtliche Verbindungen wurden in hochgereinigtem, wasserfreiem Olivenöl gelöst und intraperitoneal verabfolgt.

In den folgenden Untersuchungen werden diese 11 Substanzen auf 5 Verbindungsklassen so verteilt, daß jeweils einer Klasse eine homologe Reihe zugeordnet wird:

Klasse 1 - 2	Halogenierte Monoaromaten
Klasse 3 - 4	Nicht-halogenierte Diaromaten
Klasse 5 - 7	Alkyl-phenyl-Sulfone
Klasse 8 - 10	Alkyl-phenyl-Sulfide
Klasse 11	Diisocyanierte Diphenylsulfone

Synthetisiert wurden diese Verbindungen im Biochemischen Institut der Slowakischen Akademie der Wissenschaften in Bratislava. Die Toxizität ist bei einigen Verbindungen bekannt. Sie liegt mit einer LD_{50} (in mg/kg Maus) zwischen 70 und 400 mg/kg, also jeweils über dem therapeutische

zu testenden Konzentrationsbereich. Eine Aktivität gegen Protozoen in vitro wurde festgestellt bei Trypanosoma cruzi und Leishmania brasiliensis (Konzentrationsbereich 5 - 50 mg/kg); eine gute Wirkung bei oraler Verabreichung konnte auch bei der Hühner-Kokzidiose (Eimeria tenella) in Dosierungen von 50 - 100 mg/kg beobachtet werden (BALAN, persönl. Mitteilungen).

a) Untersuchungen zu den halogenierten Monoaromaten p-Bromphenylisothiocyanat (Nr. 1) und p-Brombenzylisothiocyanat (Nr. 2)

aa) Körpertemperatur (Tab. 7, Abb. 5)

Wie Abb. 7 zeigt, verlaufen die Temperaturkurven der 3 mit Isothiocyanaten therapierten Tiergruppen vom 6. Tag p.i. an weit unterhalb der Kontrollkurve ($p < 0{,}001$). Der rasch einsetzende Temperaturabfall nach Therapiebeginn am 5. Tag p.i. ist Ausdruck einer beträchtlichen Toxizität dieser Verbindungen. Bei der Substanz Nr. 2 vermag selbst eine Dosisverminderung auf ein Viertel (Nr. 2 b) nicht, die abfallende Charakteristik des Temperaturverlaufes zu beeinflussen. Die Tiere sterben an der Giftwirkung.

bb) Hämoglobingehalt (Tab. 8)

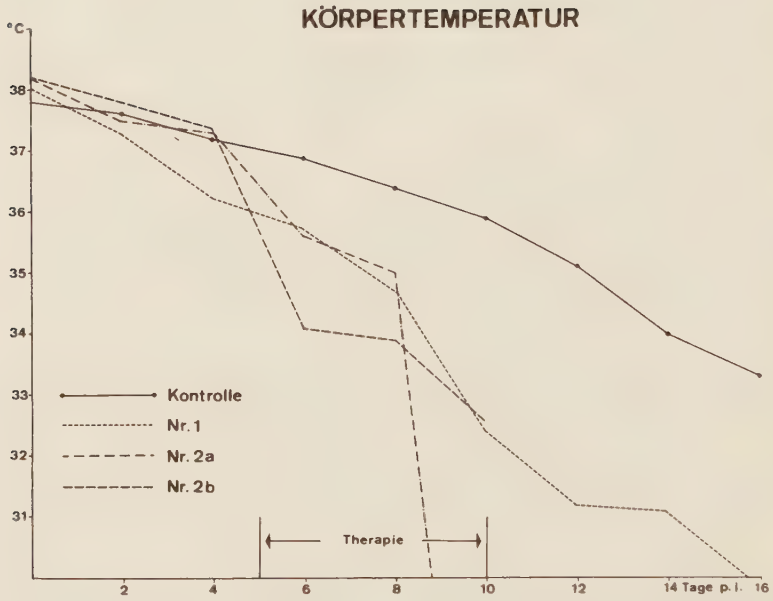
Auch die Hämoglobinwerte lassen keinen therapeutischen Effekt erkennen. Da die meisten Tiere der drei 8er Gruppen zwischen dem 5. und 10. Tag p.i. zum Exitus kommen, ist ein Vergleich der Hb-Werte mit statistischen Methoden nicht mehr möglich.

Tab. 7 Körpertemperatur in °C

Tage p.i.		0.	2.	4.	6.	8.	10.	12.	14.	16.
Kontrolle	$\bar{x}$	37,8	37,6	37,2	36,9	36,4	35,9	35,1	34,0	33,3
	$s_{\bar{x}}$	±0,1	±0,1	±0,1	±0,1	±0,1	±0,1	±0,2	±0,2	±0,3
	N	(32)	(64)	(64)	(64)	(60)	(60)	(48)	(36)	(14)
Nr. 1	$\bar{x}$	38,0	37,3	36,2	35,7	34,7	32,4	31,2	31,1	23,8
	$s_{\bar{x}}$	±0,1	±0,2	±0,4	±0,4	±0,1	±0,3	±0,3	±0,5	
20 mg/kg	N	(8)	(16)	(16)	(14)	(6)	(6)	(10)	(7)	(1)
Nr. 2_a	$\bar{x}$	38,2	37,5	37,3	35,6	35,0	24,7			
	$s_{\bar{x}}$	±0,1	±0,2	±0,2	±0,2	±1,2				
20 mg/kg	N	(8)	(16)	(16)	(13)	(4)	(1)			
Nr. 2_b	$\bar{x}$	38,2	37,8	37,4	34,1	33,9	32,6			
	$s_{\bar{x}}$	±0,2	±0,2	±0,3	±0,4	±0,5	±1,7			
5mg/kg	N	(8)	(16)	(8)	(8)	(11)	(3)			

Mittlere Körpertemperatur der mit Plasmodium berghei infizierten Mäuse nach Applikation von 20 mg p-Bromphenylisothiocyanat (Nr.1), 20 mg p-Brombenzylisothiocyanat (Nr.2_a) und 5 mg p-Brombenzylisothiocyanat (Nr.2_b)/kg

Abbildung 5



Mittlere Körpertemperatur der mit Plasmodium berghei infizierten Mäuse nach Applikation von 20 mg p-Bromphenylisothiocyanat (Nr.1), 20 mg p-Brombenzylisothiocyanat (Nr.2_a) und 5 mg p-Brombenzylisothiocyanat (Nr.2_b)/kg

Tab. 8 Hämoglobingehalt in g %

	N	Kontrolle	N	Nr. 1	N	Nr. 2_a	N	Nr. 2_b
0. Tag p.i.	32	15,6 ± 0,2	8	15,8 ± 0,4	8	15,5 ± 0,3	8	16,0 ± 0,5
5. Tag p.i.	32	10,9 ± 0,4	8	9,8 ± 0,7	8	10,6 ± 0,9	8	9,5 ± 1,0
10. Tag p.i.	30	5,3 ± 0,5	6	4,8 ± 0,2	1	3,5	2	4,6 ± 2,8
15. Tag p.i.	14	3,1 ± 0,5	4	2,9 ± 0,7	0	-	0	-

Angegeben sind der Mittelwert $\bar{x}$ und sein mittlerer Fehler $s_{\bar{x}}$

Mittlerer Hämoglobingehalt der mit Plasmodium berghei infizierten Mäuse nach Applikation von 20 mg p-Bromphenylisothiocyanat (Nr.1), 20 mg p-Brombenzylisothiocyanat (Nr.2_a) und 5 mg p-Brombenzylisothiocyanat (Nr.2_b)/kg

cc) Parasitämie (Tab. 9)

Die nach der Behandlung - am 10. Tag p.i. - ermittelten Parasitämiewerte weisen aus, daß der frühe Tod der Tiere (vgl. Tab. 26) auf eine toxische Wirkung der Substanzen und nicht etwa auf einen besonders hohen Befall der Erythrozyten durch die Plasmodien zurückzuführen ist. Sie lassen ferner deutlich erkennen, daß die hier geprüften Verbindungen selbst in diesen bereits toxischen Konzentrationen therapeutisch inaktiv sind.

b) Untersuchungen zu den nichthalogenierten Diaromaten Diphenylisothiocyanat (Nr. 3) und (1)-Naphthylmethylisothiocyanat (Nr. 4)

aa) Körpertemperatur (Tab. 10, Abb. 6)

Betrachtet man die beiden Temperaturkurven nach Applikation der Substanzen Nr. 3 und Nr. 4, dann fällt die Ähnlichkeit mit den Verlaufsformen in Abb. 5 auf. Bereits am 6. Tag p.i. sind die Temperaturen um 2 - 3°C gegenüber der Ausgangstemperatur abgesunken und damit auch deutlich gegenüber den unbehandelten Kontrollen erniedrigt ($p < 0,05$). Für diesen starken Temperaturabfall müssen wiederum toxische Einflüsse verantwortlich gemacht werden.

bb) Hämoglobingehalt (Tab. 11)

Gegenüber den unbehandelten Kontrollen weicht der mittlere Hämoglobingehalt des Blutes nach Applikation der zu prüfenden Substanzen weder am 10. noch am 15. Tag p.i. signifikant ab.

Parasitämie in %

	N	Kontrolle	N	Nr. 1	N	Nr. 2_a	N	Nr. 2_b
Parasitierte erw. Erythrozyten (%)								
am 5. Tag p.i.	32	3,8 ± 0,4	8	5,7 ± 0,9	8	6,1 ± 1,1	8	6,5 ± 1,2
am 10. Tag p.i.	30	1,4 ± 0,2	6	3,2 ± 1,0	1	3,6	2	2,2 ± 1,6
am 15. Tag p.i.	14	1,1 ± 0,5	4	0,9 ± 0,3	0	-	0	-
Parasitierte polychrom. Erythrozyten (%)								
am 5. Tag p.i.	32	78,4 ± 3,5	8	100,0 ± 0,0	8	97,4 ± 2,6	8	90,0 ± 3,2
am 10. Tag p.i.	30	94,2 ± 1,6	6	96,2 ± 3,8	1	100,0	2	95,7 ± 2,7
am 15. Tag p.i.	14	89,0 ± 2,7	4	99,1 ± 0,6	0	-	0	-
Gesamt-Parasitämie (%)								
am 5. Tag p.i.	32	5,6 ± 0,3	8	6,5 ± 1,8	8	7,8 ± 1,6	8	9,5 ± 1,7
am 10. Tag p.i.	30	22,8 ± 1,6	6	23,6 ± 3,2	1	29,2	2	27,5 ± 5,2
am 15. Tag p.i.	14	38,2 ± 2,4	4	43,6 ± 4,7	0	-	0	-
Polychromasie (%)								
am 5. Tag p.i.	32	2,4 ± 0,1	8	1,9 ± 0,3	8	2,0 ± 0,6	8	3,6 ± 0,8
am 10. Tag p.i.	30	23,6 ± 1,7	6	32,5 ± 6,4	1	26,6	2	27,1 ± 5,9
am 15. Tag p.i.	14	42,9 ± 3,4	4	43,5 ± 5,0	0	-	0	-

Angegeben sind der Mittelwert $\bar{x}$ und sein mittlerer Fehler $s_{\bar{x}}$

Mittelwert der Parasitämie der mit Plasmodium berghei infizierten Mäuse nach Applikation von 20 mg p-Bromphenylisothiocyanat (Nr.1), 20 mg p-Brombenzylisothiocyanat (Nr.2_a) und 5 mg p-Brombenzylisothiocyanat (Nr.2_b)/kg

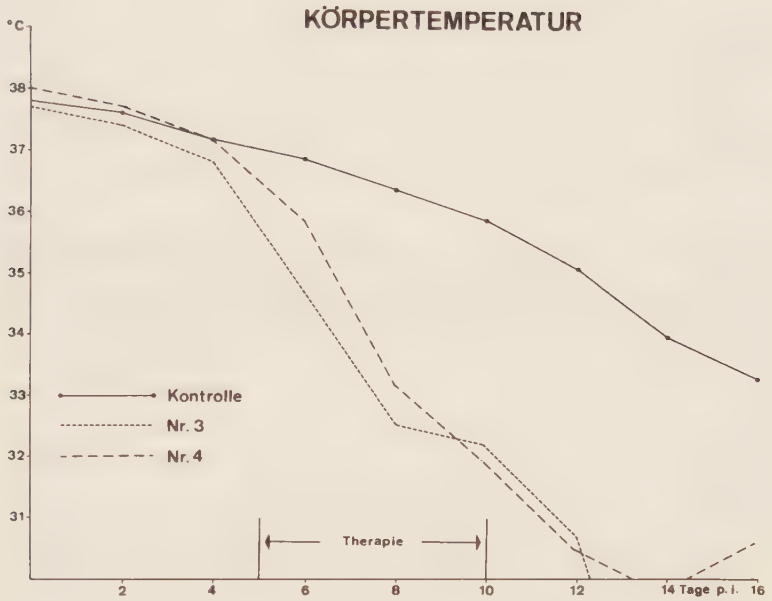
Tab. 9

Tab. 10 Körpertemperatur in °C

Tage p.i.		0.	2.	4.	6.	8.	10.	12.	14.	16.
Kontrolle	$\bar{x}$	37,8	37,6	37,2	36,9	36,4	35,9	35,1	34,0	33,3
	$s_{\bar{x}}$	±0,1	±0,1	±0,1	±0,1	±0,1	±0,1	±0,2	±0,2	±0,3
	N	(32)	(64)	(64)	(64)	(60)	(60)	(48)	(36)	(14)
Nr. 3 20 mg/kg	$\bar{x}$	37,7	37,4	36,8	34,7	32,6	32,2	30,7	25,8	-
	$s_{\bar{x}}$	±0,1	±0,3	±0,7	±0,5	±0,6	±0,6	±0,4	±0,7	-
	N	(8)	(16)	(16)	(14)	(6)	(5)	(8)	(3)	-
Nr. 4 20 mg/kg	$\bar{x}$	38,0	37,7	37,2	35,9	33,2	31,9	30,5	29,7	30,6
	$s_{\bar{x}}$	±0,1	±0,1	±0,4	±0,4	±0,7	±1,5	±0,9	±1,1	±1,5
	N	(8)	(16)	(16)	(16)	(8)	(6)	(8)	(6)	(2)

Mittlere Körpertemperatur der mit Plasmodium berghei infizierten Mäuse nach Applikation von 20 mg Diphenylisothiocyanat (Nr.3) und 20 mg (1)-Naphthylmethylisothiocyanat (Nr.4)/kg

Abbildung 6



Mittlere Körpertemperatur der mit Plasmodium berghei infizierten Mäuse nach Applikation von 20 mg Diphenylisothiocyanat (Nr.3) und 20 mg (1)-Naphthylmethylisothiocyanat (Nr.4)/kg

Tab. 11 Hämoglobingehalt in g %

	N	Kontrolle	N	Nr. 3	N	Nr. 4
0	32	15,6 ± 0,2	8	15,4 ± 0,2	8	16,1 ± 0,3
5. Tag p.i.	32	10,9 ± 0,4	8	10,3 ± 0,3	8	11,4 ± 0,6
10. Tag p.i.	30	5,3 ± 0,5	5	4,7 ± 0,7	5	5,7 ± 1,2
15. Tag p.i.	14	3,1 ± 0,8	0	-	2	2,5 ± 1,0

Angegeben sind der Mittelwert $\bar{x}$ und sein mittlerer Fehler $s_{\bar{x}}$

Mittlerer Hämoglobingehalt der mit Plasmodium berghei infizierten Mäuse nach Applikation von 20 mg Diphenylisothiocyanat (Nr.3) und 20 mg (1)-Naphthylmethylisothiocyanat (Nr.4)/kg

cc) Parasitämie (Tab. 12)

Wie die in der Tabelle zusammengestellten Mittelwerte zeigen, bleibt die Behandlung mit den Substanzen Nr. 3 und Nr. 4 auf die Vermehrung der Plasmodien ohne signifikanten Einfluß. Da die gewählten Konzentrationen bereits toxische Effekte zeigen - wie die relativ kurzen Überlebenszeiten ausweisen (vgl. Tab. 26) - ist eine Erhöhung der Dosierung nicht möglich.

c) Untersuchungen zu den Alkyl-phenyl-Sulfonen p-Methylsulfophenylisothiocyanat (Nr. 5), p-Äthylsulfophenylisothiocyanat (Nr. 6) und p-n-Octylsulfophenylisothiocyanat (Nr. 7)

C-1) Versuche mit steigenden Dosierungen der Substanz Nr. 5

Bei der Testung des p-Methylsulfophenylisothiocyanates wurde versucht, mit drei steigenden Konzentrationen (20, 40 und 80 mg/kg) Verbesserungen eines möglichen Therapieeffektes zu erzielen. Diese Verbindungsklasse erscheint deshalb interessant, weil ihr eine sulfonamidanaloge bzw. sulfonamidisostere Konfiguration zugrunde liegt und sie damit u.a. als potentieller PAB-Antagonist fungieren könnte.

aa) Körpertemperatur (Tab. 13, Abb. 7)

Die Temperaturkurve nach Applikation der Substanz Nr. 5_a (20 mg/kg) folgt eng der Kontrollkurve. Wie die Kurvenzüge der steigenden Konzentrationen Nr. 5_b und Nr. 5_c zeigen, ist eine positive Beeinflussung des Infektions-

Tab. 12

Parasitämie in %

	N	Kontrolle	N	Nr. 3	N	Nr. 4
Parasitierte erw. Erythrozyten (%)						
am 5. Tag p.i.	32	3,8 ± 0,4	8	2,1 ± 1,2	8	5,2 ± 0,7
am 10. Tag p.i.	30	1,4 ± 0,2	5	2,9 ± 2,9	5	3,6 ± 0,8
am 15. Tag p.i.	14	1,1 ± 0,5	0	-	2	1,7 ± 1,7
Parasitierte polychrom. Erythrozyten (%)						
am 5. Tag p.i.	32	78,4 ± 3,5	8	71,1 ± 15,6	8	68,7 ± 16,3
am 10. Tag p.i.	30	94,2 ± 1,6	5	97,2 ± 2,2	5	87,1 ± 9,4
am 15. Tag p.i.	14	89,0 ± 2,7	0	-	2	100,0
Gesamt-Parasitämie (%)						
am 5. Tag p.i.	32	5,6 ± 0,3	8	6,6 ± 0,6	8	6,9 ± 0,7
am 10. Tag p.i.	30	22,8 ± 1,6	5	34,2 ± 6,7	5	30,1 ± 5,2
am 15. Tag p.i.	14	38,2 ± 2,4	0	-	2	38,7 ± 8,3
Polychromasie (%)						
am 5. Tag p.i.	32	2,4 ± 0,1	8	6,5 ± 2,9	8	2,6 ± 0,7
am 10. Tag p.i.	30	23,0 ± 1,7	5	33,2 ± 6,4	5	31,7 ± 7,6
am 15. Tag p.i.	14	42,9 ± 3,4	0	-	2	38,8 ± 3,0

Angegeben sind der Mittelwert $\bar{x}$ und sein mittlerer Fehler $s_{\bar{x}}$

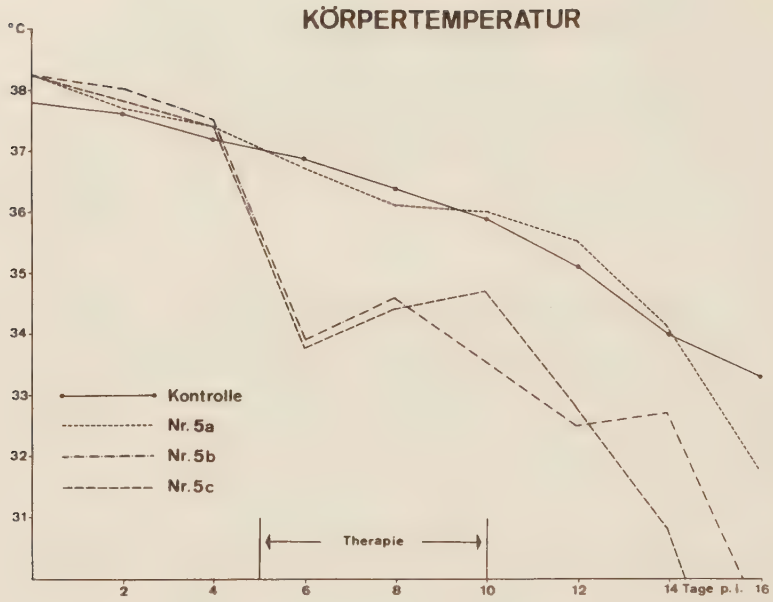
Mittelwert der Parasitämie der mit Plasmodium berghei infizierten Mäuse nach Applikation von 20 mg Diphenylisothiocyanat (Nr.3) und 20 mg (1)-Naphthylmethylisothiocyanat (Nr.4)/kg

Tab. 13 Körpertemperatur in °C

Tage p.i.		0.	2.	4.	6.	8.	10.	12.	14.	16.
Kontrolle	$\bar{x}$	37,8	37,6	37,2	36,9	36,4	35,9	35,1	34,0	33,3
	$s_{\bar{x}}$	±0,1	±0,1	±0,1	±0,1	±0,1	±0,1	±0,2	±0,2	±0,3
	N	(32)	(64)	(64)	(64)	(60)	(60)	(48)	(36)	(14)
Nr. 5_a 20 mg/kg	$\bar{x}$	38,2	37,7	37,4	36,7	36,1	36,0	35,5	34,1	31,8
	$s_{\bar{x}}$	±0,1	±0,2	±0,3	±0,2	±1,1	±0,8	±0,6	±0,3	±0,7
	N	(8)	(16)	(16)	(16)	(8)	(6)	(10)	(10)	(7)
Nr. 5_b 40 mg/kg	$\bar{x}$	38,2	38,0	37,5	33,9	34,6	33,5	32,5	32,7	28,8
	$s_{\bar{x}}$	±0,1	±0,1	±0,1	±0,8	±0,3	±1,2	±1,6	±1,2	±0,3
	N	(8)	(16)	(8)	(7)	(12)	(6)	(4)	(4)	(2)
Nr. 5_c 80 mg/kg	$\bar{x}$	38,2	37,8	37,4	33,8	34,4	34,7	32,8	30,8	26,7
	$s_{\bar{x}}$	±0,2	±0,3	±0,2	±0,6	±0,5	±0,4	±0,4	±1,1	-
	N	(8)	(16)	(8)	(15)	(8)	(5)	(4)	(4)	(1)
Nr. 6 40 mg/kg	$\bar{x}$	37,9	37,7	37,3	34,4	35,0	34,2	33,0	32,6	30,1
	$s_{\bar{x}}$	±0,3	±0,2	±0,2	±0,5	±0,3	±0,6	±0,6	±0,5	±1,2
	N	(8)	(16)	(8)	(15)	(12)	(7)	(3)	(6)	(3)
Nr. 7 20 mg/kg	$\bar{x}$	37,8	37,5	37,6	35,8	34,9	34,3	34,7	34,0	31,5
	$s_{\bar{x}}$	±0,2	±0,1	±0,4	±0,4	±0,4	±0,8	±0,3	±0,3	±0,5
	N	(8)	(16)	(8)	(15)	(14)	(9)	(4)	(7)	(3)

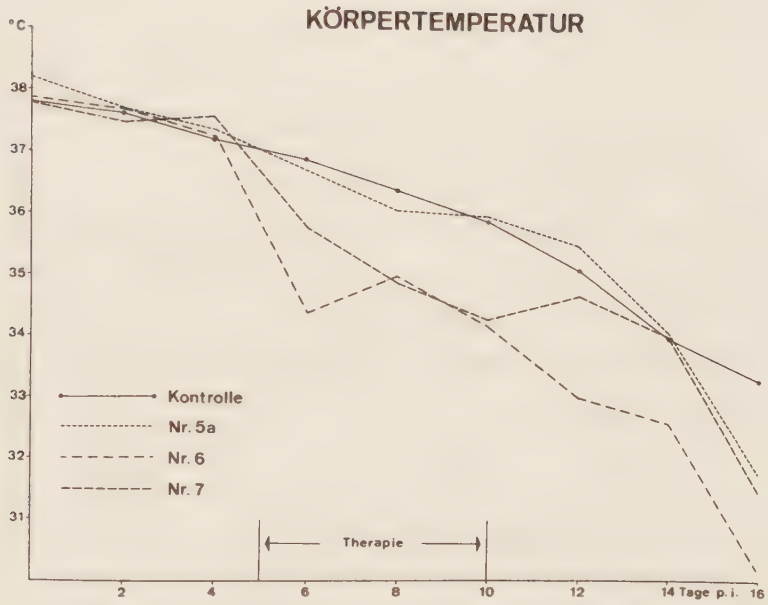
Mittlere Körpertemperatur der mit Plasmodium berghei infizierten Mäuse nach Applikation von 20 mg p-Methylsulfophenylisothiocyanat (Nr.5_a), 40 mg p-Methylsulfophenylisothiocyanat (Nr.5_b), 80 mg p-Methylsulfophenylisothiocyanat (Nr.5_c), 40 mg p-Äthylsulfophenylisothiocyanat (Nr.6) und 20 mg p-n-Octylsulfophenylisothiocyanat (Nr.7) pro kg

A b b i l d u n g 7



Mittlere Körpertemperatur der mit Plasmodium berghei infizierten Mäuse nach Applikation von 20 mg p-Methylsulfophenylisothiocyanat (Nr. 5_a), 40 mg p-Methylsulfophenylisothiocyanat (Nr.5_b) und 80 mg p-Methylsulfophenylisothiocyanat (Nr.5_c)/kg

A b b i l d u n g 8



Mittlere Körpertemperatur der mit Plasmodium berghei infizierten Mäuse nach Applikation von 20 mg p-Methylsulfophenylisothiocyanat ($Nr.5_a$), 40 mg p-Äthylsulfophenylisothiocyanat (Nr.6) und 20 mg p-n-Octylsulfophenylisothiocyanat (Nr.7)/kg

verlaufes durch eine Erhöhung der Dosis jedoch nicht möglich, da die toxischen Nebenwirkungen bereits so stark sind, und einen weiteren raschen Temperaturabfall auslösen. ($p < 0{,}001$ am 6. Tag p.i.).

bb) Hämoglobingehalt (Tab. 14)

Die Charakteristik der Hb-Werte ist bei allen drei geprüften Konzentrationen fallend. Bei den höheren Konzentrationen (Nr. 5_b und Nr. 5_c) ist das relative Absinken zwar etwas gebremst, doch überschneidet sich hier ein geringer therapeutischer mit einem wesentlich stärkeren toxischen Effekt.

cc) Parasitämie (Tab. 15)

Der schwache therapeutische Effekt zeigt sich nicht nur in der verringerten Parasitämie nach Abschluß der Behandlung am 10. Tag p.i., sondern auch in der relativ niedrigen Polychromasie, da die Blutneubildung zum Ausgleich des Erythrozytenverlustes weniger als im normalen Infektionsverlauf stimuliert wird. Am 10. Tag p.i. sind aber bei den höheren Dosierungen (Nr. 5_b und 5_c) auch nur noch je 3 der 8 Versuchstiere am Leben, so daß die plasmodiostatische Aktivität der Substanzen infolge ihrer Giftigkeit am Ende bedeutungslos bleibt.

Tab. 14 Hämoglobingehalt in g %

	N	Kontrolle	N	Nr. 5_a	N	Nr. 5_b	N	Nr. 5_c
0. Tag p.i.	32	15,6 ± 0,2	8	15,3 ± 0,5	8	15,8 ± 0,3	8	15,8 ± 0,4
5. Tag p.i.	32	10,9 ± 0,4	8	10,5 ± 0,5	8	11,2 ± 0,6	8	10,6 ± 0,6
10. Tag p.i.	30	5,3 ± 0,5	5	6,3 ± 0,4	3	8,1 ± 1,3	3	7,5 ± 1,4
15. Tag p.i.	14	3,1 ± 0,5	5	3,7 ± 0,3	0	-	0	-

Angegeben sind der Mittelwert $\bar{x}$ und sein mittlerer Fehler $s_{\bar{x}}$

Mittlerer Hämoglobingehalt der mit Plasmodium berghei infizierten Mäuse nach Applikation von 20 mg p-Methylsulfophenylisothiocyanat (Nr.5_a), 40 mg p-Methylsulfophenylisothiocyanat (Nr.5_b) und 80 mg p-Methylsulfophenylisothiocyanat (Nr.5_c)/kg

Tab. 15

Parasitämie in %

	N	Kontrolle	N	Nr. 5_a	N	Nr. 5_b	N	Nr. 5_c
Parasitierte erw. Erythrozyten (%)								
am 5. Tag p.i.	32	3,8 ± 0,4	8	4,5 ± 1,6	8	5,6 ± 2,6	8	3,9 ± 0,8
am 10. Tag p.i.	30	1,4 ± 0,2	5	2,0 ± 0,9	3	3,1 ± 1,5	3	1,6 ± 0,9
am 15. Tag p.i.	14	1,1 ± 0,5	5	3,7 ± 0,7		-		-
Parasitierte polychrom. Erythrozyten (%)								
am 5. Tag p.i.	32	78,4 ± 3,5	8	68,4 ± 7,5	8	74,6 ± 9,2	8	83,5 ± 8,8
am 10. Tag p.i.	30	94,2 ± 1,6	5	89,1 ± 6,2	3	80,0 ± 11,4	3	86,3 ± 13,7
am 15. Tag p.i.	14	89,0 ± 2,7	5	92,6 ± 1,7		-	2	-
Gesamt-Parasitämie (%)								
am 5. Tag p.i.	32	5,6 ± 0,3	8	5,5 ± 1,5	8	8,3 ± 2,4	8	5,8 ± 1,9
am 10. Tag p.i.	30	22,8 ± 1,6	5	18,8 ± 1,2	3	13,0 ± 2,9	3	10,7 ± 2,4
am 15. Tag p.i.	14	38,2 ± 2,4	5	28,0 ± 5,9		-		-
Polychromasie (%)								
am 5. Tag p.i.	32	2,4 ± 0,1	8	1,6 ± 0,5	8	4,2 ± 0,9	8	2,3 ± 1,1
am 10. Tag p.i.	30	23,6 ± 1,7	5	19,2 ± 3,2	3	12,8 ± 3,4	3	10,8 ± 2,8
am 15. Tag p.i.	14	42,9 ± 3,4	5	27,4 ± 7,0		-		-

Angegeben sind der Mittelwert $\bar{x}$ und sein mittlerer Fehler $s_{\bar{x}}$

Mittelwert der Parasitämie der mit Plasmodium berghei infizierten Mäuse nach Applikation von 20 mg p-Methylsulfophenylisothiocyanat (Nr.5_a), 40 mg p-Methylsulfophenylisothiocyanat (Nr.5_b) und 80 mg p-Methylsulfophenylisothiocyanat (Nr.5_c)/kg

C-2) Vergleichende Untersuchungen an den Verbindungen Nr. 5, Nr. 6 und Nr. 7

Nach dem Vergleich der Wirkung verschiedener Konzentrationen ein und derselben Verbindung (p-Methylsulfophenylisothiocyanat) wurde der Einfluß von Substanzen aus einer homologen Reihe (p-Methyl-, p-Äthyl- und p-n-Octylsulfophenylisothiocyanat) auf den Verlauf der Pl. berghei-Infektion in der Maus untersucht.

Was die biophysikalischen Eigenschaften einer solchen homologen Reihe betrifft, dürfte sich mit zunehmender Kettenlänge des Alkylrestes die Lipoidlöslichkeit und damit das Permeirungsvermögen für Zellmembranen erhöhen. Eine gesteigerte Permeirung ließe sich auch etwas grob durch eine einfache Konzentrationserhöhung erzwingen. Proportional zu der erwünschten Wirkung würden natürlich auch die Nebenwirkungen anwachsen. Um solche toxischen Seiteneffekte niedrig zu halten, ist es sinnvoller, eine steigende Lipoidlöslichkeit bei dafür geringerer Dosierung zu erproben.

aa) Körpertemperatur (Tab. 13, Abb. 8)

Vergleicht man Abb. 7 mit Abb. 8, so fällt auf, daß die Kurven Nr. 5_c (80 mg/kg der Methyl-Verbindung) und Nr. 6 (40 mg/kg Äthyl-Verbindung) ähnlich verlaufen. Dasselbe gilt für die mit Sicherheit sehr gut lipoidlöslichen Ver-

bindung Nr. 7 (20 mg/kg der n-Octyl-Verbindung). Aus dem Temperaturverlauf läßt sich somit ablesen, daß bei steigender Lipoidlöslichkeit - also bei verlängerter Alkylseitenkette - mit geringeren toxischen Nebenwirkungen gerechnet werden kann.

bb) Hämoglobingehalt (Tab. 16)

Das Ausmaß der Blutzerstörung, wie es durch den Hämoglobingehalt ausgewiesen wird, bleibt durch die Applikation der Substanzen Nr. 6 und 7 unbeeinflußt.

cc) Parasitämie (Tab. 17)

Die Vermehrung der Plasmodien wird durch die hier geprüften Sulfophenylisothiocyanaten mit verlängerter Seitenkette (p-Äthylsulfophenylisothiocyanat und p-n-Octylsulfophenylisothiocyanat) - deren Dosierung etwa ihrer Toxizität entspricht (vgl. Tab. 26) - nicht gehemmt. Die relativ größte Wirksamkeit entfaltet die Substanz Nr. 5, deren toxische Nebenwirkungen bei der Dosierung von 40 mg/kg allerdings schon ausgeprägt sind.

Tab. 16 Hämoglobingehalt in g %

	N	Kontrolle	N	Nr. 5_c	N	Nr. 6	N	Nr. 7
0. Tag p.i.	32	15,6 ± 0,2	8	15,8 ± 0,4	8	15,9 ± 0,4	8	15,6 ± 0,5
5. Tag p.i.	32	10,9 ± 0,4	8	10,6 ± 0,6	8	10,6 ± 0,6	8	9,7 ± 0,4
10. Tag p.i.	30	5,3 ± 0,5	3	7,5 ± 1,4	3	5,4 ± 0,8	4	5,9 ± 0,9
15. Tag p.i.	14	3,1 ± 0,8	0	-	3	3,5 ± 0,6	3	4,8 ± 1,1

Angegeben sind der Mittelwert $\bar{x}$ und sein mittlerer Fehler $s_{\bar{x}}$

Mittlerer Hämoglobingehalt der mit Plasmodium berghei infizierten Mäuse nach Applikation von 80 mg p-Methylsulfophenylisothiocyanat (Nr.5_c), 40 mg p-Äthylsulfophenylisothiocyanat (Nr.6) und 20 mg p-n-Octylsulfophenylisothiocyanat (Nr.7)/kg

Tab. 17

Parasitämie in %

	N	Kontrolle	N	Nr. 5_b	N	Nr. 6	N	Nr. 7
Parasitierte erw. Erythrozyten (%)								
am 5. Tag p.i.	32	3,8 ± 0,4	8	5,6 ± 2,6	8	3,6 ± 1,3	8	5,4 ± 1,6
am 10. Tag p.i.	30	1,4 ± 0,2	3	3,1 ± 1,5	3	3,6 ± 2,0	4	2,3 ± 3,7
am 15. Tag p.i.	14	1,1 ± 0,5		±	3	2,1 ± 3,8	3	2,4 ± 1,5
Parasitierte polychrom. Erythrozyten (%)								
am 5. Tag p.i.	32	78,4 ± 3,5	8	74,6 ± 9,2	8	82,5 ± 11,1	8	93,5 ± 4,9
am 10. Tag p.i.	30	94,2 ± 1,6	3	80,0 ± 11,4	3	91,9 ± 3,1	4	72,1 ± 9,8
am 15. Tag p.i.	14	89,0 ± 2,7		-	3	95,8 ± 8,6	3	85,7 ± 11,4
Gesamt-Parasitämie (%)								
am 5. Tag p.i.	32	5,6 ± 0,3	8	8,3 ± 2,4	8	6,8 ± 1,2	8	7,5 ± 1,6
am 10. Tag p.i.	30	22,8 ± 1,6	3	13,0 ± 2,9	3	21,9 ± 8,1	4	20,5 ± 0,8
am 15. Tag p.i.	14	38,2 ± 2,4		-	3	36,6 ± 10,8	3	28,4 ± 15,1
Polychromasie (%)								
am 5. Tag p.i.	32	2,4 ± 0,1	8	4,2 ± 0,9	8	3,6 ± 0,2	8	2,5 ± 0,2
am 10. Tag p.i.	30	23,6 ± 1,7	3	12,8 ± 3,4	3	20,6 ± 7,5	4	26,0 ± 3,3
am 15. Tag p.i.	14	42,9 ± 3,4		-	3	36,8 ± 9,5	3	29,7 ± 14,1

Angegeben sind der Mittelwert $\bar{x}$ und sein mittlerer Fehler $s_{\bar{x}}$

Mittelwert der Parasitämie der mit Plasmodium berghei infizierten Mäuse nach Applikation von 40 mg p-Methylsulfophenylisothiocyanat (Nr.5_b), 40 mg p-Äthylsulfophenylisothiocyanat (Nr.6) und 20 mg p-n-Octylsulfophenylisothiocyanat (Nr.7)/kg

d) Untersuchungen zu den Alkyl-phenyl-Sulfiden p-Methylthiophenylisothiocyanat (Nr. 8), p-Äthylthiophenylisothiocyanat (Nr. 9) und p-n-Octylthiophenylisothiocyanat (Nr. 10)

d-1) Versuche mit steigenden Dosierungen der Substanz Nr. 8

Entsprechend der Versuchsanordnung bei Substanz Nr. 5 wurde geprüft, ob sich bei der Substanz Nr. 8 ein Therapieeffekt durch Applikation steigender Konzentrationen (20, 40 und 80 mg/kg) erzielen läßt.

aa) Körpertemperatur (Tab. 18, Abb. 9)

Beim Vergleich der Temperaturkurven für die steigenden Konzentrationen fällt die Ähnlichkeit der Thio- mit den Sulfo-Verbindungen in Bezug auf ihre Aktivität auf (Abb.7 und Abb. 9). Nach Abschluß der Behandlung, am 10. und 12. Tag p.i., ist die Differenz der Kurve Nr. 8_b (40 mg/kg) zur Kontrollkurve signifikant ($p < 0,05$). Der weitere Verlauf der Infektion wird dann jedoch nicht mehr beeinflußt. Eine nochmalige Verdopplung der Dosis auf 80 mg/kg wirkt bereits so toxisch, daß schon am 8. Tag p.i. alle Tiere sterben.

bb) Hämoglobingehalt (Tab. 19)

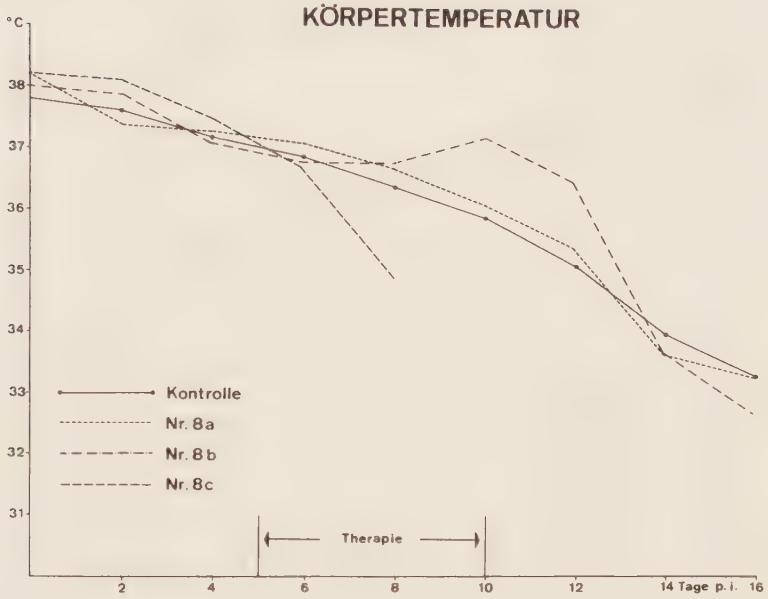
Der in der relativ hohen Körpertemperatur am 10. und 12. Tag p.i. angedeutete kurative Effekt der Substanz Nr. 8 in der Dosierung von 40 mg/kg zeigt sich auch im Hämo-

Tab. 18 Körpertemperatur in °C

Tage p.i.		0.	2.	4.	6.	8.	10.	12.	14.	16.
Kontrolle	$\bar{x}$	37,8	37,6	37,2	36,9	36,4	35,9	35,1	34,0	33,3
	$s_{\bar{x}}$	±0,1	±0,1	±0,1	±0,1	±0,1	±0,1	±0,2	±0,2	±0,3
	N	(32)	(64)	(64)	(64)	(60)	(60)	(48)	(36)	(14)
Nr. 8_a 20 mg/kg	$\bar{x}$	38,2	37,4	37,3	37,1	36,7	36,1	35,4	33,7	33,3
	$s_{\bar{x}}$	±0,1	±0,2	±0,1	±0,1	±0,6	±0,6	±0,6	±0,5	±0,9
	N	(8)	(16)	(16)	(16)	(6)	(6)	(8)	(8)	(4)
Nr. 8_b 40 mg/kg	$\bar{x}$	38,0	37,9	37,1	36,8	36,8	37,2	36,5	33,7	32,7
	$s_{\bar{x}}$	±0,2	±0,1	±0,8	±0,5	±0,4	±0,6	±0,6	±0,2	±0,2
	N	(8)	(16)	(8)	(16)	(15)	(7)	(10)	(10)	(10)
Nr. 8_c 80 mg/kg	$\bar{x}$	38,2	38,1	37,5	36,7	34,9	-	-	-	-
	$s_{\bar{x}}$	±0,1	±0,2	±0,5	±0,4	±0,9	-	-	-	-
	N	(8)	(16)	(8)	(16)	(11)	-	-	-	-
Nr. 9 40 mg/kg	$\bar{x}$	38,2	38,2	37,1	34,1	34,4	31,7	32,0	31,8	29,9
	$s_{\bar{x}}$	±0,3	±0,2	±0,3	±0,4	±0,5	±0,8	±0,5	±0,6	±0,4
	N	(8)	(16)	(8)	(16)	(9)	(8)	(3)	(6)	(2)
Nr. 10 40 mg/kg	$\bar{x}$	37,8	37,7	37,7	37,1	36,1	34,9	34,7	33,8	32,9
	$s_{\bar{x}}$	±0,3	±0,2	±0,3	±0,3	±0,3	±0,8	±0,3	±0,6	±1,0
	N	(8)	(16)	(8)	(15)	(14)	(12)	(5)	(6)	(3)

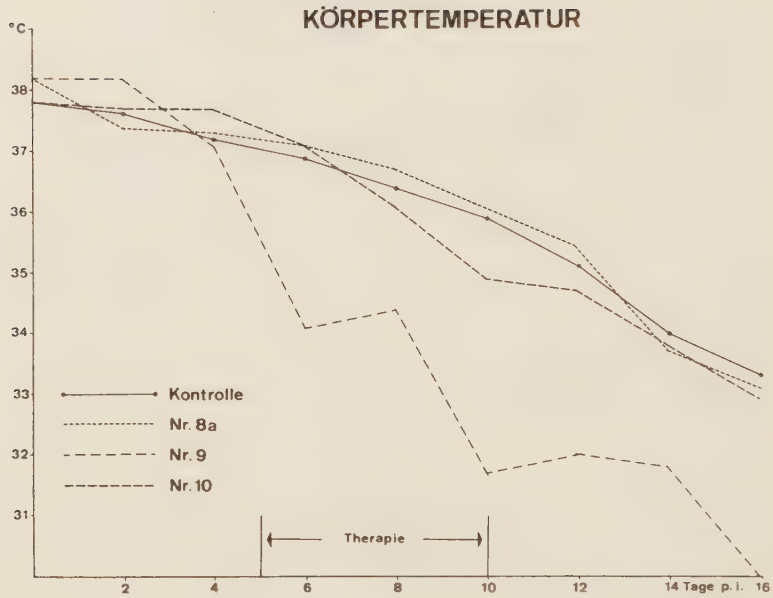
Mittlere Körpertemperatur der mit Plasmodium berghei infiziertan Mäuse nach Applikation von 20 mg p-Methylthiophenylisothiocyanat (Nr.8_a), 40 mg p-Methylthiophenylisothiocyanat (Nr.8_b), 80 mg p-Methylthiophenylisothiocyanat (Nr.8_c), 40 mg p-Äthylthiophenylisothiocyanat (Nr.9) und 40 mg p-n-Octylthiophenylisothiocyanat (Nr.10)/kg.

A b b i l d u n g 9



Mittlere Körpertemperatur der mit Plasmodium berghei infizierten Mäuse nach Applikation von 20 mg p-Methylthiophenylisothiocyanat ($Nr.8_a$), 40 mg p-Methylthiophenylisothiocyanat ($Nr.8_b$) und 80 mg p-Methylthiophenylisothiocyanat ($Nr.8_c$)/kg

A b b i l d u n g 10



Mittlere Körpertemperatur der mit Plasmodium berghei infizierten Mäuse nach Applikation von 20 mg p-Methylthiophenylisothiocyanat ($Nr.8_a$), 40 mg p-Äthylthiophenylisothiocyanat (Nr.9) und 40 mg p-n-Octylthiophenylisothiocyanat (Nr.10)/kg

Tab. 19 Hämoglobingehalt in g %

	N	Kontrolle	N	Nr. 8_a	N	Nr. 8_b	N	Nr. 8_c
0. Tag p.i.	32	15,6 ± 0,2	8	15,9 ± 0,4	8	15,5 ± 0,4	8	15,5 ± 0,3
5. Tag p.i.	32	10,9 ± 0,4	8	11,5 ± 0,7	8	11,0 ± 0,5	8	9,9 ± 0,7
10. Tag p.i.	30	5,3 ± 0,5	6	6,1 ± 1,4	7	8,4 ± 0,9	0	-
15. Tag p.i.	14	3,1 ± 0,8	4	3,7 ± 0,6	5	3,9 ± 1,2	0	-

Angegeben sind der Mittelwert $\bar{x}$ und sein mittlerer Fehler $s_{\bar{x}}$

Mittlerer Hämoglobingehalt der mit Plasmodium berghei infizierten Mäuse nach Applikation von 20 mg p-Methylthiophenylisothiocyanat (Nr.8_a), 40 mg p-Methylthiophenylisothiocyanat (Nr.8_b) und 80 mg p-Methylthiophenylisothiocyanat (Nr.8_c)/kg

globinwert für den 10. Tag p.i., der signifikant ($p < 0,01$) gegenüber dem Mittelwert der Kontrolltiere erhöht ist. Die niedrigere Konzentration (20 mg/kg) vermag dagegen noch nicht, die infektionsbedingte Erythrozytenzerstörung zu verhindern.

cc) Parasitämie (Tab. 20)

Entsprechend niedrig ist am 10. Tag p.i. das Ausmaß der Polychromasie bei Applikation der Substanz Nr. 8 in der Dosierung von 40 mg/kg (gegenüber der Kontrolle ist $p < 0,001$), und der die Plasmodienentwicklung hemmende Effekt ist in der verringerten Parasitämie nach Abschluß der Behandlung deutlich abzulesen ($p < 0,001$). Allerdings ist diese plasmodiostatische Wirkung nicht von Dauer, denn bereits am 15. Tag p.i. weichen die Parasitämiewerte nicht mehr signifikant voneinander ab.

d-2) Vergleichende Untersuchungen an den Verbindungen Nr. 8, Nr. 9 und Nr. 10

Entsprechend der Testreihe mit den Sulfophenylisothiocyanaten wurde der Einfluß von Thiophenylisothiocyanaten innerhalb einer homolgen Reihe verglichen.

Parasitämie in %

	N	Kontrolle	N	Nr. 8_a	N	Nr. 8_b	N	Nr. 8_c
Parasitierte erw. Erythrozyten (%)								
am 5. Tag p.i.	32	3,8 ± 0,4	8	4,3 ± 1,8	8	5,3 ± 1,3	8	3,5 ± 0,8
am 10. Tag p.i.	30	1,4 ± 0,2	6	1,8 ± 0,6	6	0,9 ± 0,5	0	-
am 15. Tag p.i.	14	1,1 ± 0,5	4	2,9 ± 0,8	5	2,3 ± 1,6	0	-
Parasitierte polychrom. Erythrozyten (%)								
am 5. Tag p.i.	32	78,4 ± 3,5	8	75,0 ± 13,7	8	63,3 ± 12,1	8	90,8 ± 6,0
am 10. Tag p.i.	30	94,2 ± 1,6	6	80,3 ± 3,7	6	76,8 ± 6,0	0	-
am 15. Tag p.i.	14	89,0 ± 2,7	4	96,7 ± 2,3	5	97,0 ± 1,8	0	-
Gesamt-Parasitämie (%)								
am 5. Tag p.i.	32	5,6 ± 0,3	8	4,7 ± 0,8	8	7,6 ± 1,3	8	4,7 ± 1,2
am 10. Tag p.i.	30	22,8 ± 1,6	6	16,6 ± 1,8	6	7,8 ± 1,8	0	-
am 15. Tag p.i.	14	38,2 ± 2,4	4	35,6 ± 7,0	5	34,8 ± 5,4	0	-
Polychromasie (%)								
am 5. Tag p.i.	32	2,4 ± 0,1	8	0,9 ± 0,3	8	3,9 ± 3,5	8	1,3 ± 0,6
am 10. Tag p.i.	30	23,6 ± 1,7	6	18,9 ± 2,9	6	9,1 ± 2,9	0	-
am 15. Tag p.i.	14	42,9 ± 3,4	4	34,0 ± 7,0	5	34,4 ± 5,3	0	-

Angegeben sind der Mittelwert $\bar{x}$ und sein mittlerer Fehler $s_{\bar{x}}$

Mittelwert der Parasitämie der mit Plasmodium berghei infizierten Mäuse nach Applikation von 20 mg p-Methylthiophenylisothiocyanat (Nr.8_a), 40 mg p-Methylthiophenylisothiocyanat (Nr.8_b) und 80 mg p-Methylthiophenylisothiocyanat (Nr.8_c)/kg

Tab. 20

aa) Körpertemperatur (Tab. 18, Abb. 10)

Wie aus dem Verlauf der obigen vier Temperaturkurven hervorgeht, ist die Toxizität von Substanz Nr. 9, dem Äthylhomologen, wesentlich größer als die der Methyl- und n-Octyl-Verbindung. Der toxische Einfluß steigt mit zunehmender Lipoidlöslichkeit, die auf einer Seitenkettenverlängerung beruht. Die miteinander korrespondierenden Werte vom 6. bis zum 10. Tag p.i. sind in ihren Unterschieden hoch gesichert ($p < 0{,}001$).

bb) Hämoglobingehalt (Tab. 21)

Während sich die Applikation von Substanz Nr. 10 nicht auf den Hämoglobingehalt im Blut der Versuchstiere auswirkt, sind für die Substanz Nr. 9 die Unterschiede zu den Kontrollen nicht nur direkt nach der Behandlung - am 10. Tag p.i. - mit $p < 0{,}001$, sondern auch noch am 15. Tag p.i. mit $p < 0{,}01$ statistisch gut gesichert.

cc) Parasitämie (Tab. 22)

Bei gleicher Dosierung (40 mg/kg) zeigen nur die Substanzen Nr. 8 und Nr. 9 einen gesicherten plasmodiostatischen Effekt ($p < 0{,}001$ bzw. $p < 0{,}01$), der aber nur bei Substanz Nr. 9 auch am 15. Tag p.i. noch signifikant ($p < 0{,}01$) ist. Durch die Applikation des Präparates Nr. 10 dagegen wird die Vermehrung der Plasmodien überhaupt nicht beeinflußt.

Tab. 21 Hämoglobingehalt in g %

	N	Kontrolle	N	Nr. 8_b	N	Nr. 9	N	Nr. 10
0. Tag p.i.	32	15,6 ± 0,2	8	15,5 ± 0,4	8	15,5 ± 0,4	8	15,8 ± 0,3
5. Tag p.i.	32	10,9 ± 0,4	8	11,0 ± 0,5	8	11,2 ± 0,7	8	11,0 ± 0,6
10. Tag p.i.	30	5,3 ± 0,5	7	8,4 ± 0,9	4	8,6 ± 0,8	6	5,5 ± 0,5
15. Tag p.i.	14	3,1 ± 0,8	5	3,9 ± 1,2	2	5,7 ± 0,9	3	3,2 ± 0,7

Angegeben sind der Mittelwert $\bar{x}$ und sein mittlerer Fehler $s_{\bar{x}}$

Mittlerer Hämoglobingehalt der mit Plasmodium berghei infizierten Mäuse nach Applikation von 40 mg p-Methylthiophenylisothiocyanat (Nr.8_b), 40 mg p-Äthylthiophenylisothiocyanat (Nr.9) und 40 mg p-n-Octylthiophenylisothiocyanat (Nr.10)/kg

Tab. 22

Parasitämie in %

	N	Kontrolle	N	Nr. 8_b	N	Nr. 9	N	Nr. 10
Parasitierte erw. Erythrozyten (%)								
am 5. Tag p.i.	32	3,8 ± 0,4	8	5,3 ± 1,3	8	5,3 ± 1,6	8	6,1 ± 0,9
am 10. Tag p.i.	30	1,4 ± 0,2	6	0,9 ± 0,5	4	2,8 ± 0,9	6	3,8 ± 0,8
am 15. Tag p.i.	14	1,1 ± 0,5	5	2,3 ± 1,6	2	3,0 ± 0,8	3	2,0 ± 0,5
Parasitierte polychrom. Erythrozyten (%)								
am 5. Tag p.i.	32	78,4 ± 3,5	8	63,3 ± 12,1	8	61,7 ± 22,1	8	52,2 ± 15,8
am 10. Tag p.i.	30	94,2 ± 1,6	6	76,8 ± 6,0	4	84,3 ± 3,0	6	97,5 ± 1,3
am 15. Tag p.i.	14	89,0 ± 2,7	5	97,0 ± 1,8	2	97,0 ± 1,1	3	93,5 ± 1,8
Gesamt-Parasitämie (%)								
am 5. Tag p.i.	32	5,6 ± 0,3	8	7,6 ± 1,3	8	6,6 ± 0,9	8	7,4 ± 1,2
am 10. Tag p.i.	30	22,8 ± 1,6	6	7,8 ± 1,8	4	13,4 ± 2,3	6	28,0 ± 3,4
am 15. Tag p.i.	14	38,2 ± 2,4	5	34,8 ± 5,4	2	20,9 ± 2,4	3	37,4 ± 5,1
Polychromasie (%)								
am 5. Tag p.i.	32	2,4 ± 0,1	8	3,9 ± 3,5	8	2,3 ± 0,1	8	2,8 ± 0,2
am 10. Tag p.i.	30	23,6 ± 1,7	6	9,1 ± 2,9	4	13,3 ± 6,4	6	25,9 ± 4,8
am 15. Tag p.i.	14	42,9 ± 3,4	5	34,4 ± 5,3	2	19,0 ± 1,6	3	29,8 ± 6,2

Angegeben sind der Mittelwert $\bar{x}$ und sein mittlerer Fehler $s_{\bar{x}}$

Mittelwert der Parasitämie der mit Plasmodium berghei infizierten Mäuse nach Applikation von 40 mg p-Methylthiophenylisothiocyanat (Nr.8_b), 40 mg p-Äthylthiophenylisothiocyanat (Nr.9) und 40 mg p-n-Octylthiophenylisothiocyanat (Nr.10)/kg

e) Untersuchungen zu dem zweifach isothiocyanierten Diphenylsulfon 4.4'-Diisothiocyanatdiphenylsulfon (Nr. 11)

e-1) Versuche mit steigenden Dosierungen der Substanz Nr. 11

Wie bei den vorangegangenen Versuchen wird wiederum geprüft, ob bei der vorliegenden Substanz Nr. 11 mit steigenden Dosierungen (10, 20 und 40 mg/kg) ein Therapieeffekt zu beobachten ist.

aa) Körpertemperatur (Tab. 23, Abb. 11)

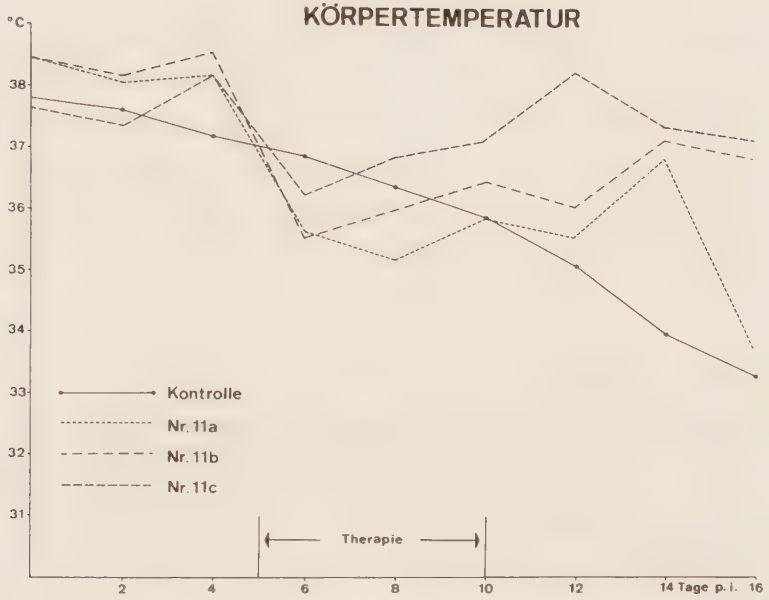
Bei der Betrachtung des Temperaturverlaufes der mit drei aktiven Wirkgruppen (2 N=C=S, 1 SO_2) beladenen Verbindung fällt auf, daß praktisch keine Analogien mehr zu den Temperaturkurven der vorangehend untersuchten einfach isothiocyanierten Verbindungen bestehen. Dagegen zeigen sich bei den Substanzen Nr. 11_b und 11_c wieder Ähnlichkeiten mit den Kurvenverläufen der Versuche Terramycin II und III, sowie von Terramycin I + PAS und Terramycin III + PAS. Während bei den Terramycinversuchen das Temperaturminimum am 8. Tag p.i. auftritt, erfolgen bei der Substanz Nr. 11 in Konzentrationen von 20 bzw. 40 mg/kg (Nr. 11_b und 11_c) bereits am 6. Tag p.i. die endgültigen Wiederanstiege der Temperaturen als Ausdruck einer kurativen Wirkung. Da schon bei der Konzentration von 40 mg/kg ein sehr guter antiparasitärer Effekt besteht, wird aus Gründen der Toxizität auf eine weitere Dosisverdopplung verzichtet.

Tab. 23 Körpertemperatur in °C

Tage p.i.		0.	2.	4.	6.	8.	10.	12.	14.	16.
Kontrolle	$\bar{x}$	37,8	37,6	37,2	36,9	36,4	35,9	35,1	34,0	33,3
	$s_{\bar{x}}$	±0,1	±0,1	±0,1	±0,1	±0,1	±0,1	±0,2	±0,2	±0,3
	N	(32)	(64)	(64)	(64)	(60)	(60)	(48)	(36)	(14)
Nr.11_a	$\bar{x}$	38,5	38,1	38,2	35,7	35,2	35,9	35,6	36,9	33,8
	$s_{\bar{x}}$	±0,1	±0,1	±0,2	±0,1	±0,1	±0,1	±0,2	±0,1	±0,2
	N	(8)	(16)	(16)	(14)	(12)	(10)	(8)	(6)	(6)
Nr.11_b	$\bar{x}$	38,5	38,2	38,6	35,6	36,0	36,5	36,1	37,2	36,9
	$s_{\bar{x}}$	±0,2	±0,2	±0,1	±0,2	±0,1	±0,2	±0,1	±0,3	±0,1
	N	(8)	(16)	(16)	(14)	(8)	(6)	(6)	(6)	(6)
Nr.11_c	$\bar{x}$	37,7	37,4	38,2	36,3	36,9	37,2	38,3	37,9	37,2
	$s_{\bar{x}}$	±0,1	±0,1	±0,2	±0,1	±0,2	±0,1	±0,2	±0,1	±0,2
	N	(8)	(16)	(16)	(16)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)

Mittlere Körpertemperatur der mit Plasmodium berghei infizierten Mäuse nach Applikation von 10 mg p.p'-Diisocyanatdiphenylsulfon (Nr.11_a), 20 mg p.p'-Diisocyanatdiphenylsulfon (Nr.11_b) und 40 mg p.p'-Diisocyanatdiphenylsulfon (Nr.11_c)/kg

A b b i l d u n g 11



Mittlere Körpertemperatur der mit Plasmodium berghei infizierten Mäuse nach Applikation von 10 mg p.p'-Diisocyanatdiphenylsulfon ($Nr.11_a$), 20 mg p.p'-Diisocyanatdiphenylsulfon ($Nr.11_b$) und 40 mg p.p'-Diisocyanatdiphenylsulfon ($Nr.11_c$)/kg

bb) Hämoglobingehalt (Tab. 24)

Die therapeutische Wirksamkeit der Substanz Nr. 11 drückt sich außerdem deutlich in den Hämoglobinwerten aus. So zeigt sich bei Substanz Nr. 11_c nach einem kurzfristigen Absinken der Hb-Werte zwischen dem 5. und 10. Tag p.i. um 5 g% im weiteren Verlauf bis zum 15. Tag p.i. eine rasche Erholung bis auf nur 2,6 g% unter dem Ausgangswert. Auch hier besteht wieder, wenn man ansteigende Konzentrationen vergleicht, eine gewisse Parallelität zu den Hämoglobinwerten der Terramycinversuche.

cc) Parasitämie (Tab. 25)

Vergleicht man die Gesamtparasitämien von Substanz Nr. 11_a, 11_b und 11_c dann beobachtet man eine fallende Tendenz, die bei der Dosiserhöhung von 20 auf 40 mg/kg besonders augenfällig wird.

Die geringe Restparasitämie von 1,5 % bei Substanz Nr. 11_c erklärt die relativ hohe Überlebensquote von 6/8. Wiederum in Analogie zu den Terramycinversuchen nimmt mit steigender Dosierung der Parasitierungsgrad der jugendlichen Erythrozyten ab. Die Polychromasie durchläuft am 10. Tag p.i. in allen drei Konzentrationsbereichen ein Maximum.

Tab. 24 Hämoglobingehalt in g %

	N	Kontrolle	N	Nr. 11_a	N	Nr. 11_b	N	Nr. 11_c
0. Tag p.i.	32	15,6 ± 0,2	8	15,3 ± 0,1	8	15,7 ± 0,2	8	15,6 ± 0,2
5. Tag p.i.	32	10,9 ± 0,4	8	10,5 ± 0,4	8	11,1 ± 0,4	8	11,5 ± 0,3
10. Tag p.i.	30	5,3 ± 0,5	5	6,6 ± 0,3	3	10,1 ± 0,3	6	10,3 ± 0,2
15. Tag p.i.	14	3,1 ± 0,8	3	5,0 ± 0,6	3	8,5 ± 0,5	6	13,0 ± 0,3

Angegeben sind der Mittelwert $\bar{x}$ und sein mittlerer Fehler $s_{\bar{x}}$

Mittlerer Hämoglobingehalt der mit Plasmodium berghei infizierten Mäuse nach Applikation von 10 mg p.p'-Diisocyanatdiphenylsulfon (Nr.11_a), 20 mg p.p'-Diisocyanatdiphenylsulfon (Nr.11_b) und 40 mg p.p'-Diisocyanatdiphenylsulfon (Nr.11_c)/kg

Tab. 25

Parasitämie in %

	N	Kontrolle	N	Nr. 11_a	N	Nr. 11_b	N	Nr. 11_c
Parasitierte erw. Erythrozyten (%)								
am 5. Tag p.i.	32	3,8 ± 0,4	8	9,0 ± 0,3	8	7,8 ± 0,4	8	2,5 ± 0,5
am 10. Tag p.i.	30	1,4 ± 0,2	5	2,0 ± 0,2	3	2,0 ± 0,3	6	0,5 ± 0,1
am 15. Tag p.i.	14	1,1 ± 0,5	3	7,5 ± 0,4	3	7,3 ± 1,5	6	1,0 ± 0,2
Parasitierte polychrom. Erythrozyten (%)								
am 5. Tag p.i.	32	70,4 ± 3,5	8	0,4 ± 0,4	8	0,9 ± 0,4	8	0,8 ± 2,4
am 10. Tag p.i.	30	94,2 ± 1,6	5	10,1 ± 2,4	3	8,1 ± 2,1	6	0,2 ± 0,2
am 15. Tag p.i.	14	89,8 ± 2,7	3	9,0 ± 2,6	3	18,6 ± 3,1	6	5,2 ± 1,6
Gesamt-Parasitämie (%)								
am 5. Tag p.i.	32	5,6 ± 0,3	8	9,9 ± 0,1	8	8,0 ± 0,2	8	5,0 ± 0,2
am 10. Tag p.i.	30	22,8 ± 1,6	5	3,4 ± 0,2	3	5,6 ± 0,3	6	0,1 ± 0,2
am 15. Tag p.i.	14	38,2 ± 2,4	3	37,0 ± 2,0	3	27,6 ± 2,4	6	1,5 ± 0,3
Polychromasie (%)								
am 5. Tag p.i.	32	2,4 ± 0,1	8	0,2 ± 0,1	8	0,4 ± 0,2	8	0,7 ± 0,2
am 10. Tag p.i.	30	23,0 ± 1,7	5	9,0 ± 1,5	3	4,2 ± 1,6	6	23,5 ± 3,2
am 15. Tag p.i.	14	42,9 ± 3,4	3	1,8 ± 0,4	3	1,9 ± 0,6	6	16,9 ± 2,4

Angegeben sind der Mittelwert $\bar{x}$ und sein mittlerer Fehler $s_{\bar{x}}$

Mittelwert der Parasitämie der mit Plasmodium berghei infizierten Mäuse nach Applikation von 10 mg p.p'-Diisocyanatdiphenylsulfon (Nr.11_a), 20 mg p.p'-Diisocyanatdiphenylsulfon (Nr.11_b) und 40 mg p.p'-Diisocyanatdiphenylsulfon (Nr.11_c)/kg

e-2) Vergleichende Untersuchungen zu den Mono-isothiocyanaten und Terramycin

Analog zu den einfachen Isothiocyanaten führt Substanz Nr. 11, ein Di-isothiocyanat, am 6. Tag p.i. zu einem toxisch bedingten Temperaturminimum. Im weiteren Verlauf jedoch zeigen die Temperaturkurven von Substanz Nr. 11_b und 11_c eine weitgehende Ähnlichkeit mit den Kurven von Versuch Terramycin II und III.

Parasitämie- und Hämoglobinwerte lassen sich nicht mehr mit den entsprechenden Werten der Mono-isothiocyanate vergleichen. Vielmehr besteht im Versuchsverlauf mit Substanz Nr. 11_c eine gewisse Parallelität zu den Werten bei einer hohen Terramycindosierung.

f) Bewertung der Ergebnisse

Im folgenden werden die Einzelergebnisse der Isothiocyanattherapie vergleichend zusammengefasst.

1) p-Bromphenylisothiocyanat, die einfachste Verbindung aus der gesamten Reihe ist, abgesehen von ihrer Unwirksamkeit, deutlich weniger toxisch als ihr höheres Homologes.

2) p-Brombenzylisothiocyanat zeigt bei 20 mg/kg keinerlei therapeutische, dagegen bereits stark toxische Wirkung (mittlere Körpertemperatur am 10. Tag p.i. 24,7°!). Von sämtlichen getesteten Isothiocyanaten führt seine Applikation zur niedrigsten mittleren Überlebenszeit (7,7 Tage). Allerdings steigt bei einer Dosiserniedrigung von 20 auf 5 mg/kg die mittlere Überlebenszeit etwas an (von 7,7 auf 9,2 Tage). Die niedrigen Temperaturen am 10. Tag p.i. (33,6°) lassen jedoch auch hier noch die überwiegend toxische Komponente erkennen.

3) 4) Beim Diphenylisothiocyanat (3) und (1)-Naphthylmethylisothiocyanat (4) scheint die Einführung eines zweiten Aromaten in das Molekül die Giftwirkung der entsprechenden (hier nicht getesteten) Monoaromaten zwar zu senken, doch liegen auch bei diesen beiden Verbindungen, trotz relativ angehobener mittlerer Überlebenszeit (10,0 bzw. 12,0 Tage), die Temperaturen am 10. Tag p.i. - als Ausdruck toxischer Nebenwirkungen - noch zu tief (32,2 bzw. 31,9°). Da die Parasitämie bei 20 mg/kg schnell zunimmt, wäre es wenig sinnvoll, niedrigere Dosen zu testen. Höhere Konzentrationen entfallen aus den obengenannten Gründen der Toxizität.

5) 8) p-Methylsulfophenylisothiocyanat (5) und p-Methylthiophenylisothiocyanat (8) zeigen in gewissen Grenzen eine mässige chemotherapeutische Wirkung. Eine mittlere Überlebenszeit von 13,6 und 12,0 Tagen und Temperaturen von 36,0 und 36,1° am 10. Tag p.i. ließen einen Versuch mit der doppelten Dosis (40 mg/kg) angezeigt erscheinen (Nr. 5_b bzw. Nr. 8_b). Tatsächlich können die mittlere Überlebenszeit und die Hemmwirkung auf die Parasitämie

bei der höheren Dosierung etwas angehoben werden, jedoch treten im Endeffekt auch hier keine Heilungen ein. Eine weitere Verdopplung der Dosis auf 80 mg/kg (Nr. 5_c bzw. Nr. 8_c) führt zu einem steilen Abfall unter sämtliche für eine chemotherapeutische Wirkung erforderlichen Kriterien.

6) 7) 9) 10) Die höher homologen Senföle, p-Äthyl und p-n-Octylsulfo- bzw. -thiophenylisothiocyanate, entfalten bis auf das p-Äthylthiophenylisothiocyanat (Nr. 9) neben höchstens geringer plasmodiostatischer überwiegend toxische Aktivität. Trotz zeitlich begrenzter therapeutischer Erfolge steigt die Parasitämie in den mit Mono-Isothiocyanaten behandelten Mäusen an. Bei den Hämoglobinwerten findet man entsprechend ein Absinken bis auf 1/8 der Norm. Da die Grenzen zwischen chemotherapeutischer Aktivität und letaler Toxizität zu dicht beieinander liegen und sich zum Teil sogar überschneiden, sind diese Verbindungen in der vorliegenden Form als Plasmodiostatica nicht geeignet.

11) Die einzige Ausnahme in dieser Reihe bildet die zwei Isothiocyanatgruppen im Molekül enthaltende Verbindung 4.4'-Diisocyanatdiphenylsulfon. Sie zeigt in einer Konzentration von 40 mg/kg, - bei allerdings schon angedeuter toxischer Komponente - eine gute plasmodiostatische Wirkung. Die hohe Heilungsquote von 6/8 beweist, daß mit Isothiocyanaten dann plasmodiostatische Chemotherapie betrieben werden kann, wenn durch eine günstige Substituentenanordnung der Makroorganismus toxisch weniger belastet wird.

ε) Zum Wirkungsmechanismus der Isothiocyanate

Die Senfölglukoside sind als native Isothiocyanatvorstufen eine Naturstoffklasse, deren lang umstrittene Struktur heute als die substituierte Thioiminosäureester gesichert ist. Durch eine enzymatisch ausgelöste Hydrolyse mit folgender intramolekularer Umlagerung wird die Bildung der Isothiocyanate erklärt:

$$R\text{-}SCN \longrightarrow \left[R^{+}\ SCN^{-}\right] \longrightarrow R\text{-}N{=}C{=}S$$

Bisher sind etwa 50 Glukoside des gleichen Grundgerüstes, aber mit verschiedenen Gruppen R bekannt (R = gesättigte und ungesättigte aliphatische Gruppen, unverzweigte Ketten mit Hydroxy- und Carbonylgruppen in ß- oder γ-Stellung und mit Methylmerkapto-, sulfoxy- oder -sulfonyl-Gruppen, sowie aromatische und heterocyclische Reste).

Nach KRISTIAN et al. (1964) sowie VLACHOVA und DROBNICA (1966) bestehen gewisse Beziehungen zwischen Struktur und biologischer Wirksamkeit der Isothiocyanate sowie dem Wirkungsmechanismus von Isothiocyanaten auf die zentralen Prozesse des Zellstoffwechsels. Dabei ergibt sich bei meta- und parasubstituierten Phenylisothiocyanaten eine lineare Korrelation zwischen den biologischen Wirkungsgraden (log ED_{50}; log ID_{50} *) und den Werten, welche die Reakti-

---

* ED_{50} = Molare Konzentration der wirksamen Stoffe, welche die Vermehrung der Mikroorganismen um 50% hemmen.

ID_{50} = Molare Konzentrationen der wirksamen Stoffe, welche die betrachteten Stoffwechselprozesse um 50% hemmen.

vität der NCS-Gruppe (log k) oder eine physikalische Eigenschaft des ganzen Moleküls (Logarithmus der molaren Löslichkeit oder der Verteilungskoeffizienten) charakterisieren.

Der erste Fall, bei dem die Reaktivität die den Wirkungsgrad bestimmende Eigenschaft ist, lässt sich an der bakteriostatischen Aktivität der Isothiocyanate demonstrieren (ZAHRADNIK, 1959, 1962). Der zweite Fall, bei dem die Löslichkeit die Wirkung der Isothiocyanate bestimmt, gilt für die Wachstumshemmung von Hefen.

Diese Unterschiede werden durch den verschiedenartigen Bau der Bakterien- und Hefezellen (AUGUSTIN et al., 1967) erklärt: Bei den Bakterien reagieren die Isothiocyanate mit den schon in der Membran lokalisierten Eiweißgruppen und Enzymen, daher wird ihre antimikrobielle Wirkung durch die Reaktivität bestimmt. Der Beeinflussung des Hefewachstums muß aber ein Eindringen in das Zellinnere vorausgehen. Damit hängt die intrazelluläre Inaktivierung in erster Linie von der Lipoidlöslichkeit der Isothiocyanate ab. Die Ursache der antimikrobiellen Wirkung von Isothiocyanaten liegt nach DROBNICA (1967) in einem Eingriff in den Eiweiß- und Ribonukleinsäure-Metabolismus und in der Blockierung SH-haltiger Fermente. Man nimmt an, daß die essentiellen Gruppen in der Reihenfolge SH> NH_2> OH durch Reaktion mit Isothiocyanaten blockiert werden.

Tab. 26

Mittlere Überlebenszeit und Heilungsquote der mit P. berghei infizierten Mäuse

		Überlebenszeit (Tage)	Heilungsquote
	Kontrolle (4 x 8 Tiere)	15,8	0/32
Versuchsgruppe 1	Terramycin I (5 x 33,3 mg/kg)	15,8	0/24
	Terramycin II (5 x 66,6 mg/kg)	16,6	3/24
	Terramycin III (5 x 100 mg/kg)	19,0	9/24
Versuchsgruppe 2	Terramycin I + PAS (5 x 33,3 + 750 mg/kg)	17,4	9/24
	Terramycin III + PAS (5 x 100 + 150 mg/kg)	15,4	21/24
Versuchsgruppe 3	p-Bromphenylisothiocyanat (5 x 20 mg/kg)	12,0	0/ 8
	p-Brombenzylisothiocyanat (a = 5 x 20 mg/kg)	7,7	0/ 8
	p-Brombenzylisothiocyanat (b = 5 x 5 mg/kg)	9,2	0/ 8
	Diphenylisothiocyanat (5 x 20 mg/kg)	10,5	0/ 8
	(1)-Naphthylmethylisothiocyanat (5 x 20 mg/kg)	12,0	0/ 8
	p-Methylsulfophenylisothiocyanat (a = 5 x 20 mg/kg)	15,6	0/ 8
	p-Methylsulfophenylisothiocyanat (b = 5 x 40 mg/kg)	13,9	0/ 8
	p-Methylsulfophenylisothiocyanat (c = 5 x 80 mg/kg)	12,4	0/ 8
	p-Äthylsulfophenylisothiocyanat (5 x 40 mg/kg)	13,4	0/ 8
	p-n-Octylsulfophenylisothiocyanat (5 x 20 mg/kg)	13,0	0/ 8
Versuchsgruppe 4	p-Methylthiophenylisothiocyanat (a = 5 x 20 mg/kg)	13,6	0/ 8
	p-Methylthiophenylisothiocyanat (b = 5 x 40 mg/kg)	17,6	0/ 8
	p-Methylthiophenylisothiocyanat (c = 5 x 80 mg/kg)	7,8	0/ 8
	p-Äthylthiophenylisothiocyanat (5 x 40 mg/kg)	12,5	0/ 8
	p-n-Octylthiophenylisothiocyanat (5 x 40 mg/kg)	12,6	0/ 8
	p.p'-Diisocyanatdiphenylsulfon (a = 5 x 10 mg/kg)	14,6	3/ 8
	p.p'-Diisocyanatdiphenylsulfon (b= 5 x 20 mg/kg)	13,7	3/ 8
	p.p'-Diisocyanatdiphenylsulfon (c = 5 x 40 mg/kg)	17,7	6/ 8

Die Unterteilung in Versuchsgruppen, bzw. der jeder Versuchsgruppe zugeordneten Kontrolle, bezieht sich ausschließlich auf den zeitlichen Verlauf einer Versuchsreihe.

III Schlussfolgerungen

Die Prüfung von Substanzen auf ihre Wirksamkeit gegen Plasmodium läßt sich am Modell der mit P. berghei infizierten Maus durchführen. Bei Standardisierung der Versuchsbedingungen (P. berghei- und Mäusestamm, Ernährung, Umweltfaktoren, experimenteller Stress) lassen sich Therapieversuche reproduzieren.

Die relative Unwirksamkeit der in der vorliegenden Arbeit geprüften Isothiocyanate vermag viele Ursachen zu haben. Isothiocyanate sind feuchtigkeitsempfindlich und hydrolysieren in wäßrigem Milieu, wie es ja in vivo vorliegt, mehr oder minder schnell zu bakteriostatisch weniger wirksamen Produkten, wie z.B. Thioharnstoffen oder aber zu den außerordentlich giftigen Endprodukten Anilin und Schwefelwasserstoff. Diese Schwierigkeiten ließen sich auf zwei Wegen umgehen:

1. Durch Zusatz eines Detergens, um die Membranpermeabilität der Erythrozyten zu erhöhen und damit die Verbindung schneller an den Wirkungsort zu bringen. Entsprechende Versuche, jedoch mit anderen Mikroorganismen, führten HITCHINGS et al. (1966) durch.
2. Durch Synthese (vgl. RIECHE und MARTIN, 1965) von einfachen Verbindungen, die unter physiologischen Bedingungen Isothiocyanate abspalten, wie die N-monosubstituierten Thiocarbamid- oder Dithiocarbamidsäureester.

Diese sind praktisch nicht toxisch (LD_{50}=2000 mg/kg Maus) und zeigen bakteriostatische, fungistatische und virustatische Wirkungen noch in 1 bis 0,5 γ/ml.

Die Wirksamkeit der Tetracycline ist eindeutig und braucht nicht mehr besonders hervorgehoben zu werden. Dem eventuellen Einwand, daß die für die Plasmodien essentielle PAB-Anlieferung durch Vernichtung der Darmflora unterbunden wird, Tetracycline also nur indirekt wirken, läßt sich folgendes entgegenhalten:

1. Parenterale Gaben haben den Vorteil weitgehender Vermeidung gastrointestinaler Störungen im Sinne einer Schonung der Darmflora (HEILMEYER, 1965).
2. Da die für den Säugetierorganismus essentielle Folsäure - zu deren Aufbau PAB benötigt wird - den Mäusen exogen zugeführt werden muß, ist es wenig wahrscheinlich, daß PAB durch die Darmflora der Tiere in größeren Mengen synthetisiert wird.
3. Die bei normaler Ernährung exogen zugeführte PAB übersteigt um ein Mehrfaches die von den Plasmodien pro Tag benötigte Menge (JERUSALEM, 1966).
4. Bei den z.T. in hohen Konzentrationen (bis zur 40-fachen bakteriostatischen Dosis/g Maus verabfolgten Isothiocyanaten treten trotz Schädigung der Darmflora hohe Parasitämiewerte auf.

Wie schon erwähnt, benötigt der reversible Übergang der Tetrahydrofolsäure in die Hydroxymethyl-tetrahydrofolsäure als Cofaktoren Pyridoxal und Mn^{++}-Ionen. Dasselbe

dürfte für die im Parasiten leicht abgewandelten analogen Strukturen und Systeme gelten. An dieser wichtigen Schaltstelle wäre eine Unterbrechung in zweierlei Weise denkbar: Einmal durch Abfangen der Mn^{++}-Ionen mit noch stärkeren Chelat- oder Komplexbildnern als sie Terramycin und PAS darstellen, zum andern durch kompetitive Verdrängung des Pyridoxals mit dem Antimetaboliten Isonikotinsäurehydrazid oder eines seiner Derivate.

Die Chemotherapie der Malaria und der Tuberkulose weist Parallelen auf: Beide Infektionskrankheiten sprechen an auf Sulfathiazole, p,p'-Diaminodiphenylsulfon, ß-Naphthylamin, PAS, 4-Aminochinoline, Acridinderivate, Streptomycin, Terramycin (SCHÖNHÖFER, 1948; SCHNITZER-HAWKING, 1963).
Zu untersuchen bliebe noch Isonikotinsäurehydrazid oder eines seiner Derivate.

IV Zusammenfassung

Tetracycline

Das Antibioticum Terramycin, eine bakteriostatische Verbindung, deren Wirkungsmechanismus noch nicht in allen Einzelheiten geklärt ist, wurde in 3 verschiedenen Konzentrationen mit und ohne Paraaminosalicylsäure-Zusatz auf seine plasmodiostatischen Eigenschaften geprüft.

Dabei erbrachte die Ausgangsdosis von 33,3 mg/kg noch keine statistisch abzusichernden Unterschiede gegenüber der Kontrolle. Die doppelte Dosis führte zu einer Heilung von 16,6%, die dreifache Konzentration zu einer Heilung von 37,5% der Tiere. Die Wirkung des Terramycins ließ sich durch PAS-Zusatz eindeutig steigern. Kombinationen von minimalen therapeutischen Dosen Terramycin mit maximalen PAS-Dosen und umgekehrt führten in 37,5, bzw. 87,5% der Fälle zur vollen Heilung.

Isothiocyanate

Isothiocyanate (Senföle) wirken bakteriostatisch, fungistatisch und z.T. virostatisch. Es galt, die Frage zu klären, ob und in welchem Umfange eventuell auch eine plasmodiostatische Aktivität besteht. Untersucht wurden zu diesem Zweck die Brom- und Schwefelderivate aromatischer Isothiocyanate in den üblichen therapeutischen Konzentrationen.

Es zeigte sich, daß die dabei geprüften Mono-Isothiocyanate in der chemisch nicht maskierten, ungebundenen freien Form - in der sie appliziert wurden - für den Makroorganismus noch zu aggressiv sind. Geeignete Abwandlungen im Substituentenverhältnis bzw. eine günstige Anordnung der Substituenten im Molekül, wie sie beispielsweise im 4.4'-Diisocyanatdiphenylsulfon vorliegt, führten bei verhältnismäßig geringer toxischer Nebenwirkung zu einer Ausheilung von 75% des Kollektivs.

Alle ausgeheilten Tiere erwiesen sich gegenüber einer Reinfektion als immun.

V Literaturverzeichnis

ALBERT, A. und C. W. REES: Avidity of the tetracyclines for the cations of metals. Nature 177, 433-434 (1956).

AUGUSTIN, J., O. ONDREJICKOVA und L. DROBNICA: Differences in intracellular isothiocyanate distribution and activity in bacteria, fungi and animal cells. Internationales Symposium über Wirkungsmechanismen von Fungiziden und Antibiotica. Akademie-Verlag Berlin (1967).

BENIGNO, P., P. VISENTINI und V. FRANCESCHINI: Einfluß von Oxytetracyclin auf den Proteinstoffwechsel von E. coli während der Fortpflanzungs- und Entwicklungsstadien. Atti Accad. nat. Lincei, Mem., Cl. Sci. fisiche, mat. natur., Sez. III 8 5, 63-81 (1955).

BERNHEIM, F.: Die Wirkung von Cu-Ionen und gewisser Thioharnstoffe auf die Enzymaktivierung und Ammoniakassimilation bei einem Mycobakterium. J. Pharmacol. exp. Therapeut. 119, 93-98 (1957).

BLAKLEY, R. L.: The interconversion of serine and glycine: Participation of pyridoxal phosphate. Biochem. J. 61, 315-323 (1955).

BOX, E., W. D. GINGRICH und B. L. CELAYA: Standardization of a curative test with Plasmodium berghei in white mice. J. Infect. Dis. 94, 78-83 (1954).

DROBNICA, L.: Die Beeinflussung der Aktivität einiger Dehydrogenasen in nicht zerstörten Zellen des Ehrlichschen Ascites-Carcinom (EAC) als eines der Kriterien bei der Suche nach carcinostatischen Antibiotiken und Chemotherapeutiken. Neoplasma VII, 4, 385-391 (1960).

DROBNICA, L.: Wirkungsmechanismus einiger Isothiocyanate auf Hefen und Bakterien. Internationales Symposium über Wirkungsmechanismen von Fungiziden und Antibiotica. Akademie-Verlag Berlin (1967).

DROBNICA, L.: Synteza a infracervene spectra (p-izotiokyanatofenyl)-alkylsulfidov a (p-izotiokyanatofenyl)-alkylsulfonov. Chemicke Zvesti 21, 44-56 (1967).

DROBNICA, L. und J. AUGUSTIN: Reaction of isothiocyanates with amino acids, peptides and proteins III. Kinetics and mechanism of the reaction of aromatic isothiocyanates with thioglycolic acid. Collection Czechoslov. Chem. Commun. 30, 1618-1625 (1965).

DROBNICA, L. und J. TÖLGYESSY: Organ and intracellular distribution of 2-naphthylisothiocyanate-^{35}S. Physiol. Bohemoslov. 9, 435-440 (1960).

DROBNICA, L., M. ZEMANOVA, P. NEMEC, K. ANTOS, P. KRISTIAN, A. MARTVON and E. ZAVODSKA: Antifungal activity of isothiocyanates and related compounds. III. Derivatives of biphenyl, stilbene, azobenzene, and several polycondensed aromatic hydrocarbons. Applied Microbiology 16, 582-587 (1968).

FERONE, R. und G. H. HITCHINGS: Folate cofactor biosynthesis by Plasmodium berghei. Comparison of folate and dihydrofolate as substrates. J. Protozoology 13, 504-506 (1966).

FOYE, W. O. : Metallchelate und antituberkuläre Aktivität. 2. Mitt. p-Aminosalicylsäure. J. Amer. pharmac. Assoc., sci. Edit. 44, 415-418 (1955).

FOYE, W. O.: Die Rolle der Metallbindung bei der biologischen Aktivität von Heilmitteln. J. pharmac. Sci. 50, 93-108 (1961).

FOYE, W. O. und R. N. DUVALL: Metallchelate und antituberkuläre Wirkung. 3. Mitt. p-Aminosalicylsäure. J. Amer. pharmac. Assoc., sci. Edit. 47, 282-285 (1958).

FOYE, W. O. und J. JEFFREY: Metallchelate und antituberkuläre Aktivität. J. Amer. pharmac. Assoc., sci. Edit. 44, 257-260 (1955).

GREENBERG, D. M. und A. NICHOLAS: Studies on the purification and properties of the serine-forming enzyme system. J. Biol. Chem. 220, 775-785 (1956).

GREENBERG, D. M. und E. M. GAL: Biologische Wirkung von Malonitrilen. 3. Mitt. Wirkung der Malonitrilgabe auf die Ausscheidung von Thiocyanat bei gesunden Ratten und bei Ratten mit Walker-Ca-256. Cancer Res. 13, 226-230 (1953).

HEILMEYER, W.: Antibiotica-Fibel, Thieme Verl., Stuttgart (1965).

HERRERO, J.: The use of long-acting sulfonamides, alone or with pyrimethamine, in malaria. III. Internat. Pharmacol. Congr. Sao Paulo (1966).

HITCHINGS, G. H., J. J. BURCHALL und R. FERONE: The comparative enzymology of dihydrofolate reductase and the design of chemotherapeutic agents. In: Hitchings, Burchall und Ferone: Biochemical Studies iof Antimicrobial Drugs. University Press, Cambridge (1966).

HOLLAND, W. C., R. L. KLEIN und A. H. BRIGGS: Molekulare Pharmakologie, Thieme Verl. (1967).

JACOBI, K.: Experimentelle Untersuchungen über die Beeinflussung der Nagetiermalaria (Plasmodium berghei) in der Maus durch chemotherapeutische und diätetische Maßnahmen. Med. Dissertation 1962, Tübingen.

JACOBI, K.: Die Standardisierung der Chemotherapie der Nagetiermalaria (Plasmodium berghei) an NMRI-Mäusen. Z. Tropenmed. Parasit. 16, 258-268 (1965).

JACOBI, K. und W. KRETSCHMAR: Die Milchtherapie der Malariainfektion (Plasmodium berghei) bei der Maus. Z. Tropenmed. Parasit. 13, 286-304 (1962).

JACOBS, R. L.: Role of p-aminobenzoic acid in Plasmodium berghei infection in the mouse. Exp. Parasit. 15, 213-225 (1964).

JAENICKE, L.: Das Vorkommen von N^{10}-Formyltetrahydrofolsäure und deren allgemeine Beteiligung an der Transformylierung zur Synthese von Histidin und Purinderivate. Biochim. biophysica Acta Amsterdam 17, 588-589 (1955).

JAENICKE, L., G. R. GREENBERG und M. SILVERMAN: Über das Auftreten von N^{10}-Formyltetrahydrofolsäure bei der enzymatischen Formylierung der Tetrahydrofolsäure und den Mechanismus dieser Reaktion. Biochim. biophysica Acta Amsterdam 17, 589-591 (1955).

JAENICKE, L. und E. BRODE: N,N'-Diaryläthylendiamine als Modelle der Tetrahydrofolsäure in nichtenzymatischen Reaktionen. Liebigs Ann. Chem. 624, 120-136 (1959).

JERUSALEM, C.: Pyrimethamin-Therapie kombiniert mit p-Aminobenzoesäure-freier Diät bei der experimentelllen Malariainfektion (Plasmodium berghei). Klin. Wschr. 44, 1156-1157 (1966).

JERUSALEM, C. und W. KRETSCHMAR: Untersuchungen zur Nukleinsäuresynthese der Malaria-Erreger an milchernährten Mäusen (Plasmodium berghei). Z. Parasitenk. 28, 193-210 (1967).

KRETSCHMAR, W.: Infektionsverlauf und Krankheitsbild bei mit Plasmodium berghei infizierten Mäusen des Stammes NMRI. Z. Tropenmed. Parasit. 12, 346-367 (1961).

KRETSCHMAR, W.: Resistenz und Immunität bei mit Plasmodium berghei infizierten Mäusen. Z. Tropenmed. Parasit. 13, 159-175 (1962).

KRETSCHMAR, W.: Weitere Untersuchungen über die Immunität bei der Nagetiermalaria. Z. Tropenmed. Parasit. 14, 41-48 (1963 a).

KRETSCHMAR, W.: Die Abhängigkeit des Verlaufs der Nagetiermalaria (P. berghei) in der Maus von exogenen Faktoren und der Wahl des Mäusestammes. I. Interferierende Bartonellosen. Z. Versuchstierk. 3, 151-166 (1963 b).

KRETSCHMAR, W.: The effects of stress and diet on the resistance to Plasmodium berghei and malarial immunity in the mouse. Ann. Soc. Belge Med. Trop. 45, 325-343 (1965).

KRETSCHMAR, W.: Die Bedeutung der p-Aminobenzoesäure für den Krankheitsverlauf und die Immunität bei der Malaria im Tier (Plasmodium berghei) und im Menschen (Pl. falciparum). I. Versuche an NMRI-Mäusen. Z. Tropenmed. Parasit. 17, 301-320 (1966 a).

KRETSCHMAR, W.: Die Bedeutung der p-Aminobenzoesäure für den Krankheitsverlauf und die Immunität bei der Malaria im Tier (Plasmodium berghei) und im Menschen (Pl. falciparum). II. Untersuchungen an natürlich ernährten Kleinkindern in Nigeria. Z. Tropenmed. Parasit. 17, 369-374 (1966 b).

KRETSCHMAR, W.: Die Bedeutung der p-Aminobenzoesäure für den Krankheitsverlauf und die Immunität bei der Malaria im Tier (Plasmodium berghei) und im Menschen (Pl. falciparum). III. Untersuchungen an experimentell mit Milch ernährten Kindern. Z. Tropenmed. Parasit. 17, 375-390 (1966 c).

KRETSCHMAR, W. und U. HAAKH: Die Abhängigkeit des Verlaufs der Nagetiermalaria (Plasmodium berghei) in der Maus von exogenen Faktoren und der Wahl des Mäusestammes. II. Beunruhigung und Ernährung der Mäuse. Z. Versuchstierk. 4, 32-45 (1964).

KRETSCHMAR, W. und H.-D. MATTHAEI: Parasitämie, Anämie und Mortalität in NMRI Mäusen nach Infektion mit Plasmodium berghei in Abhängigkeit von der Parasitendichte im Inoculum. Z. Tropenmed. Parasit. 16, 187-195 (1965).

KRISTIAN, P., L. DROBNICA und P. NEMEC: Symposium über Isothiocyanate, Bratislava, 1964.

MAIER, J. und E. RILEY; Inhibition of antimalarial action of sulfonamides by p-aminobenzoic acid. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 50, 152-154 (1942).

PETERS, W.: Rational methods in the search for antimalarial drugs. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 61, 400-401 (1967).

RIECHE, A. und D. MARTIN: Symposium über Isothiocyanate. Angew. Chemie 77, 271-272 (1965).

SAKAMI, W. und R. L. KISLIUK: Stimulierung der Serin-Biosynthese in Taubenleberextrakten durch Tetrahydrofolsäure. J. Amer. Chem. Soc. 76, 1456-1457 (1954).

SAZ, A. K. und H. EAGLE: Biosynthese, Chemie und Wirkungsmechanismus des Penicillins, Streptomycins, Chloramphenicols und Tetracyclins. Annu. Rev. Microbiol. 9, 173-226 (1955).

SAZ, A. K. und R. B. SLIE: Aufhebung der Hemmung einer bakteriellen zellfreien Nitroreduktase durch Aureomycin mit Mangan. J. Amer. Chem. Soc. 75, 4626-4627 (1953).

SCHNITZER, R. J. und F. HAWKING: Experimental Chemotherapy, Vol. I, Academic Press, New York, London (1963).

SCHÖNHÖFER, F.: Naturforschung und Medizin in Deutschland 1939-1946. Chemotherapie 43 (1948).

THURSTON, J. P.: The action of dyes, antibiotics, and some miscellaneous compounds against Plasmodium berghei. Brit. J. Pharmacol. 8, 162-165 (1953).

VLACHOVA, D. und L. DROBNICA: So relationships between biological activity and physico-chemical properties of monosubstituted phenylisothiocyanates. Collection Czechoslov. Chem. Commun. 31, 997-1008 (1966).

WEINBERG, E. D.: The mutual effects of antimicrobial compounds and metallic cations. Bact. Rev. 21, 46-48 (1957).

ZAHRADNIK, R.: Geschwindigkeit der Reaktion von Alkylisothiocyanaten mit n-Butylamin und der Reaktion von Alkylaminen mit Methylisothiocyanat. Collect. Czechoslov. Chem. Commun. 24, 3422-3433 (1959).

ZAHRADNIK, R.: Einfluß der Struktur aliphatischer Substituenten auf die Stärke der biologischen Wirkung von Substanzen. Arch. int. Pharmacodynam. Therap. 135, 311-329 (1962).

WORLD HEALTH ORGANIZATION TECHNICAL REPORT SERIES: Resistance of malaria parasites to drugs. Report of a WHO Scientific Group. 296, 57 (1965).

WORLD HEALTH ORGANIZATION Committee on Malaria. Twelfth Report. 324, 10-15 (1966).

WORLD HEALTH ORGANIZATION Expert Committee on Malaria. Thirteenth Report. 357, 21 (1967).

Nach Beendigung meiner Arbeiten möchte ich mich bei allen Angehörigen des Tropenmedizinischen Institutes für die mir in jeder Weise entgegengebrachte Unterstützung bedanken.

Dieser Dank gilt in besonderem Maße Herrn Doz. Dr. W. Kretschmar für seine ständige Hilfsbereitschaft bei experimentellen und theoretischen Problemen der durchgeführten Untersuchungen.

L e b e n s l a u f

Am 22. Juli 1933 wurde ich, Rolf Heischkeil, als Sohn des Steuerinspektors Ernst Heischkeil und dessen Ehefrau Ella geb. Bechinger, in Altensteig/ Kr. Calw geboren.

Von 1940 bis 1944 besuchte ich die Volksschule in Altensteig und anschließend die Oberschulen in Altensteig und Nagold.

Mein Vater gilt seit 1944 als in Rußland vermißt.

Nach bestandener Reifeprüfung im Frühjahr 1953 begann ich im Sommersemester mit dem Studium der Chemie an der Universität Tübingen. Von 1953 bis 1955 machte ich im Rahmen eines Studium Generale das Große Latinum, das Hebraicum, sowie Dolmetscherkurse und -examina in Französisch und Englisch. 1955 schrieb ich mich außerdem in der Medizinischen Fakultät ein.

Im November 1956 legte ich die Diplom-Vorprüfung, im Oktober 1958 die ärztliche Vorprüfung und im Mai 1961 die Diplom-Hauptprüfung in Chemie ab.

1961 erwarb ich den Lehrschein der Deutschen Lebensrettungsgesellschaft mit einer Arbeit über Atem- und Kreislaufphysiologische Vorgänge beim Tauchen.

Unter Prof. Dr. Eu. Müller, Direktor des Chemischen Institutes der Universität Tübingen erfolgten in der Zeit von 1962 bis 1964 6 Publikationen auf dem Gebiet der Diazochemie und der A-homo-Steroidketone.

Nach der Promotion in Chemie im Mai 1965 setzte ich den klinischen Teil meines Medizinstudiums mit Hilfe eines Volkswagenwerk-Stipendiums fort und schloß es am 24. Juli 1968 mit dem Medizinischen Staatsexamen ab.

Im März 1966 erhielt ich von Herrn Prof. Dr. L. Fischer unter der Leitung von Herrn Doz. Dr. W. Kretschmar das Thema der vorliegenden Arbeit.